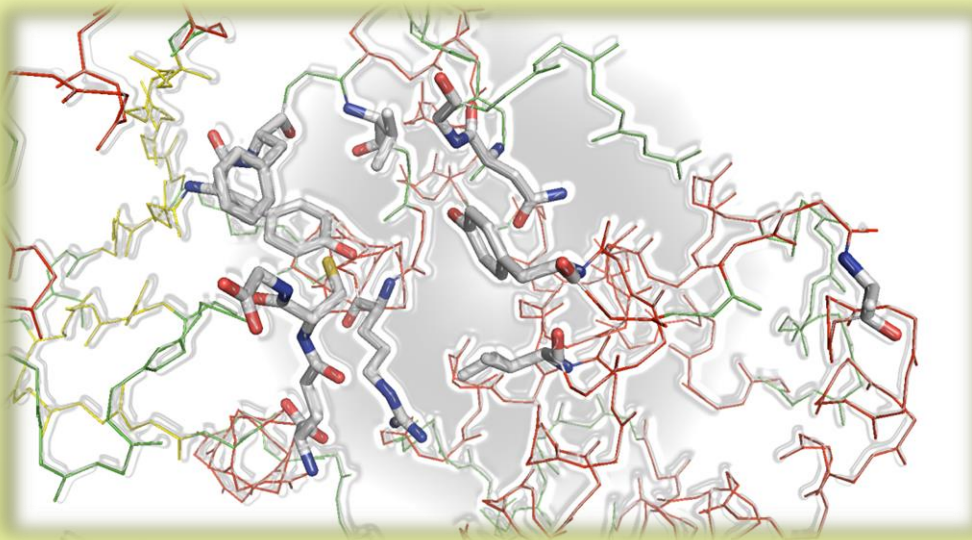


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αξιολόγηση αναλόγων γλουταθειόνης
ως υποστρωμάτων και αναστολέων
της Τρανσφεράσης Γλουταθειόνης P1-1



Νικόλαος Δ. Γεωργακής
Μεταπτυχιακή Διατριβή
ΑΘΗΝΑ 2014

*Αξιολόγηση αναλόγων γλουταθειόνης
ως υποστρωμάτων και αναστολέων
της Τρανσφεράσης Γλουταθειόνης P1-1*

Νικόλαος Δ. Γεωργακής

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας

ΑΘΗΝΑ 2014

Το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γ.Π.Α. στις 13-06-2014.

Η ορισθείσα τριμελής επιτροπή εξέτασης αποτελείται από τους:

Ιωάννη Κλώνη, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας (Επιβλέπων)

Ηλία Ηλιόπουλο, Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής

Νικόλαο Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
0.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 <i>Η τρανσφεράση γλουταθειόνης</i>	3
1.2 <i>Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης και η συμβολή τους σε φυσιολογικές λειτουργίες</i>	5
1.3 <i>Τρανσφεράσες γλουταθειόνης και καρκίνος</i>	6
1.4 <i>Δομικές και λειτουργικές διαφορές των Τρανσφερασών Γλουταθειόνης στον καρκίνο</i>	10
1.5 <i>Υποψήφια φάρμακα – αναστολείς των τρανσφερασών γλουταθειόνης στον καρκίνο</i>	11
1.6 <i>Πεπτιδομμητικά ανάλογα γλουταθειόνης</i>	19
1.7 <i>Σκοπός της παρούσας εργασίας</i>	22
2.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 ΥΛΙΚΑ	24
2.1.1 <i>Βιολογικό υλικό</i>	24
2.1.2 <i>Ένζυμα</i>	24
2.1.3 <i>Ενώσεις που αξιολογήθηκαν</i>	24
2.1.4 <i>Αναλώσιμα</i>	28
2.1.5 <i>Πλαστικά Αναλώσιμα</i>	29
2.1.6 <i>Εξοπλισμός</i>	30
2.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	30
2.2.1 <i>Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών Escherichia coli</i>	31
2.2.2 <i>Διαλύματα Αντιβιοτικών</i>	32
2.2.3 <i>Διαλύματα προσδιορισμού των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford</i>	32
2.2.4 <i>Διαλύματα και αντιδραστήρια προετοιμασίας των δεκτικών κυττάρων E. coli BL21</i>	32
2.2.5 <i>Διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αгарόζης</i>	33
2.2.6 <i>Διαλύματα για ετερόλογη έκφραση των αλλοενζύμων της hGSTP1</i>	33
2.2.7 <i>Διαλύματα για τον καθαρισμό των ενζύμων σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας</i>	34
2.2.8 <i>Διαλύματα φωτομετρικού προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας της GST</i>	34
2.2.9 <i>Διαλύματα και αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου</i>	35
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.3.1 <i>Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)</i>	37

2.3.2	Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης	38
2.3.3	Απομόνωση και Καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης	39
2.3.4	Υποκλωνοποίηση των γονιδίων των αλλοενζύμων της hGSTP1 στο πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> DH5a ή NEB Turbo	40
2.3.5	Προαγωγή ετερόλογης έκφρασης των μετασχηματισμένων κυττάρων με το υποκλωνοποιημένο γονίδιο	41
2.3.6	Θραύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος	42
2.3.7	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρησιμοποίηση εμπορικού πακέτου (kit)	42
2.3.8	Μετασχηματισμός δεκτικών εκφραστικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA	43
2.3.9	Προαγωγή ετερόλογης έκφρασης των αλλοενζύμων της hGSTP1 σε κύτταρα <i>E. coli</i> BL21(DE3)	43
2.3.10	Διαπίδυση	44
2.3.11	Καθαρισμός των αλλοενζύμων της hGSTP1 (A, B και C) με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας BES-GSH	45
2.3.12	Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας της Τρανσφεράσης της Γλουταθειόνης (GST)	46
2.3.13	Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών ενός δείγματος με τη μέθοδο κατά Bradford	47
2.3.14	Υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA)	49
2.3.15	Υπολογισμός της απόδοσης του καθαρισμού	49
2.3.16	Υπολογισμός των φορών καθαρισμού ενός ενζύμου	49
2.3.17	Λυοφιλίωση	50
2.3.18	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	50
2.3.19	Σάρωση των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων του τριπεπτιδίου της Γλουταθειόνης για πιθανή ιδιότητα υποστρώματος ή αναστολέα	53
2.3.20	Κινητική μελέτη υπολογισμού της σταθεράς Km για πεπτιδικά ανάλογα ως υποψήφια υποστρώματα, καθώς και για τα υποστρώματα GSH και CDNB των αλλοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C	56
2.3.21	Χρήση της γλυκερόλης ως μέσο μακροχρόνιας αποθήκευσης	57
2.3.22	Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	58
2.3.23	Σύνθεση του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH).....	58
3.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1	Αποτελέσματα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	60
3.2	Απομόνωση της επιθυμητής ζώνης DNA από την αρχικό προϊόν της PCR	60

3.3	Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA για αλληλούχηση	61
3.4	Καθαρισμός των αλλοενζύμων της Τρανσφεράσης Γλουταθειόνης P1	62
3.5	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου των καθαρισμένων αλλοενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C	63
3.6	Σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων της Γλουταθειόνης ως πιθανών υποστρωμάτων ή αναστολέων των αλλοενζύμων A, B και C του ισοενζύμου P1 της τρανσφεράσης Γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1A, hGSTP1B, hGSTP1C)	64
3.7	Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων των επιλεγέντων πεπτιδικών αναλόγων και των ενζύμων hGSTP1A, hGSTP1B και hGSTP1C ως προς GSH	68
3.8	Απεικόνιση της θέσης της γλουταθειόνης και της Η-θέσης του ενζύμου hGSTP1	74
4.0	ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1	Επεξηγηματική διάκριση πειραμάτων υποκλωνοποίησης και σάρωσης των 3πεπτιδίων ...	75
4.2	Σχολιασμός των αποτελεσμάτων της υποκλωνοποίησης των γονιδίων της hGSTP1	75
4.3	Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των νέων αλλοενζύμων	76
4.4	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των πεπτιδικών αναλόγων της GSH	76
4.5	Σχολιασμός του πίνακα των κινητικών παραμέτρων των επιλεγμένων πεπτιδικών αναλόγων	86
5.0	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

Aib	α -Aminoisobutyric Acid (α -Αμινοϊσοβουτυρικό οξύ)
Hyp	Hydroxyproline (Υδροξυπρολίνη)
Nle	Norleucine (Νορλευκίνη)
Nva	Norvaline (Νορβαλίνη)
Sar	N-Methylglycine (N-Μεθυλογλυκίνη ή Σαρκοσίνη)
Thi	β -(2-Thienyl)-alanine
Tic	Tetrahydro-Isoquinoline-3-Carboxylic Acid
ATP	Adenosine Triphosphate (Τριφωσφορική Αδενοσίνη)
ABC	ATP-binding cassette transporters
DDS	Drug Delivery Systems (Συστήματα Διανομής Φαρμάκων)
EA	Ethacrynic Acid (Αιθακρυνικό Οξύ)
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
rpm	revolutions per minute (στροφές ανά λεπτό)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) συνθέτουν μια πολυγονιδιακή οικογένεια ισοενζύμων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση, καθώς και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώσεων σε πληθώρα οργανισμών και ιδίως του ανθρώπου, στον οποίο εστιάζει η παρούσα μελέτη. Τα συγκεκριμένα ένζυμα εκφράζονται τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς ιστούς. Στον άνθρωπο διακρίνονται σε επτά τάξεις κυτταροπλασματικών ισοενζύμων, από τις οποίες οι συνηθέστερα εκφραζόμενες σε περιπτώσεις καρκίνου είναι οι α , μ και π . Η από τη φύση τους δράση συνδέεται και με την εμφάνιση ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην χορήγηση μεγάλου εύρους αντικαρκινικών σκευασμάτων, λόγω της εξουδετέρωσής τους μέσω της σύζευξης με το άφθονο τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH). Άμεση συνέπεια αυτών είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής. Πολλή και ενδεδειγμένη έρευνα πραγματοποιείται στην προσπάθεια εύρεσης νέων φαρμακευτικών ενώσεων ικανών να αναστέλλουν τη λειτουργία των εν λόγω ενζύμων.

Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν τριπεπτιδικά ανάλογα της γλουταθειόνης με στόχο την αξιολόγησή τους ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη δράση των ενζύμων ή να αποτελούν υποστρώματα αυτών. Αρχικά, προχωρήσαμε σε υποκλωνοποίηση των ανθρώπινων αλλοενζύμων της π τάξης (hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C) σε πλασμιδιακό φορέα για ετερόλογη έκφραση σε βακτήρια *Escherichia coli*, στον καθαρισμό τους και στη μελέτη τους έναντι των τριπεπτιδικών ενώσεων. Η επιλογή των συγκεκριμένων αλλοενζύμων έγινε με γνώμονα τα υψηλά επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται σε περιπτώσεις καρκίνου. Τα πεπτιδικά ανάλογα της γλουταθειόνης που συντέθηκαν αριθμούνται με λατινικούς χαρακτήρες σε είκοσι πέντε και είναι χωρισμένα σε τέσσερις ομάδες (A, B, Γ, Δ) με αλλαγές στο πρώτο αμινοξύ (A), στο δεύτερο (B), στο τρίτο (Γ) και σε περισσότερα από ένα αμινοξέα (Δ).

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι υπάρχει μερική εξειδίκευση ως προς την ανασταλτική δράση του πεπτιδικού αναλόγου IX (γ -Glu-Thi-Gly) για τα αλλοένζυμα hGSTP1*A & hGSTP1*C και του πεπτιδικού αναλόγου XI (γ -Glu-Cys(Acm)-Gly) για τα αλλοένζυμα hGSTP1*B & hGSTP1*C, χωρίς να παρατηρείται αξιολογη ενζυμική αναστολή από τα υπόλοιπα ανάλογα. Επιπλέον, υποστρωματική δράση εμφάνισαν πεπτίδια από τις ομάδες A και Γ, με σημαντικότερα τα πεπτίδια II (Tic-Cys-Gly) και IV (Hyp-Cys-Gly) της ομάδας A, που σημείωσαν καλή δραστηριότητα για το αλλοένζυμο hGSTP1*A (41,3% και 39,3% FA αντίστοιχα) και το πεπτίδιο XV (γ -Glu-Cys-Sar) της ομάδας Γ, που έδειξε σημαντική δραστηριότητα και για τα τρία μελετώμενα αλλοένζυμα (17%, 60,8% και 67,7% FA για τα hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C αντίστοιχα).

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) constitute a multigene superfamily of isozymes which play a crucial role in cell detoxification as well as in metabolism of xenobiotic compounds in a wide range of organisms, especially humans where upon the current project lies. These enzymes are expressed in normal and unhealthy tissues. Human cytosolic GSTs are divided in seven major classes. Among them, the most frequently expressed in cancer cells belong to classes α , μ and π . The ability of catalyzing the nucleophilic addition of the tripeptide glutathione (GSH) to a variety of chemicals bearing electrophilic functional centres is correlated with the phenomenon of multi-drug resistance (MDR) towards numerous anticancer drugs. Consequently, there has been a notable reduction in the efficacy of the anticancer therapeutic protocols. Therefore, assiduous research takes place in order to find new pharmaceutical compounds effective in inhibiting the MDR-responsible enzymes.

For that purpose, synthetic tripeptide GSH-analogues were designed and synthesized with the aim of evaluating their ability to act as inhibitors or substrates of glutathione transferases. The experimental procedure included subcloning of three human allozymes of π class (hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C) in a plasmid vector specific for overexpression in *Escherichia coli*, enzyme purification, and evaluation of the peptide analogues with the three human GSTP1 allozymes. These allozymes were selected for the increased expression levels in tumor cells. The twenty five tripeptide GSH-analogues were named after latin numbers and divided into four groups (A, B, C, D), incorporating alterations in every single amino acid position (A-C), plus in more than one positions (D).

The results of the experimental procedures indicated only partial specificity for peptide analogue IX (γ -Glu-Thi-Gly) for inhibiting allozymes hGSTP1*A & hGSTP1*C, and analogue XI (γ -Glu-Cys(Acm)-Gly) for inhibiting allozymes hGSTP1*B & hGSTP1*C, without observing significant enzyme inhibition with the rest of the analogues. Furthermore, substrate activity was recorded with peptide analogues from groups A and C. The best results were obtained using peptides II (*Tic-Cys-Gly*) and IV (*Hyp-Cys-Gly*) of group A for allozyme hGSTP1*A (41,3% and 39,3% relative activity to GSH; FA, respectively) and peptide XV (γ -Glu-Cys-Sar) of group C, which showed significant activity for all three allozymes (17%, 60,8% and 67,7% FA for hGSTP1*A, hGSTP1*B and hGSTP1*C respectively).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η τρανσφεράση γλουταθειόνης

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (*glutathione transferases*, GSTs, EC 2.5.1.18) συνιστούν μια πολυγονιδιακή οικογένεια ισοενζύμων, που ανήκουν στη Φάση II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ενώσεων (*MacIwain et al., 2006*). Αποτελούν ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση ανάμεσα σε πληθώρα οργανισμών από διαφορετικά βασιλεία και φύλα. Η κύρια αντίδραση που καταλύεται από την υπεροικογένεια αυτή περιλαμβάνει τη σύζευξη του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH, L-γ-γλουταμυλο-L-κυστείνυλο-γλυκίνη) με κάποιο υδρόφοβο υπόστρωμα, το οποίο περιέχει ηλεκτρονιόφιλο κέντρο. Η σύζευξη των εν λόγω ενώσεων με τη GSH καθιστά τα προκύπτοντα σύμπλοκα περισσότερο υδατοδιαλυτά, λιγότερο τοξικά και ταυτόχρονα υποστρώματα που αναγνωρίζονται από ATP-εξαρτώμενες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες τα απομακρύνουν από τα κύτταρα, όπως π.χ. η πρωτεΐνη MRP1 (*Multidrug Resistance-Related Protein*) (*Suzuki et al., 2001*).

Οι GSTs διακρίνονται σε τρεις διαφορετικές υπεροικογένειες. Η πρώτη οικογένεια είναι οι κυτταροπλασματικές GSTs (οι οποίες αποτελούν τη μεγαλύτερη υπεροικογένεια), η δεύτερη περιλαμβάνει τις μιτοχονδριακές και, τέλος, η τρίτη τις μικροσωματικές GSTs (MAPEG) (*Jacobsson et al., 1999a, Hayes et al., 2005*). Οι δύο πρώτες οικογένειες σχετίζονται δομικά μεταξύ τους, ενώ οι μικροσωματικές GSTs δεν ομοιάζουν με τις προαναφερθείσες (*Holm et al., 2002, Ladner et al., 2004*). Αρκετές GSTs δεν χρησιμοποιούν τη γλουταθειόνη ως υπόστρωμα, αλλά ως συμπάραγοντα, π.χ. στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων (εικοσανοειδή). Επίσης, ο ρόλος των GSTs είναι πολλαπλός, καθώς εκτός από τη δημιουργία συμπλόκων με τη γλουταθειόνη, εμπλέκονται και στη βιοσύνθεση ορμονών, στην αποδόμηση της τυροσίνης, στην κατανομή του υπεροξειδικού ανιόντος, ως και σε άλλες λειτουργίες (*Hayes et al., 2005*).

Στον άνθρωπο οι κυτταροπλασματικές GSTs διακρίνονται σε επτά τάξεις: την α (A, Alpha), μ (M, Mu), π (P, Pi), θ (T, Theta), ζ (Z, Zeta), σ (S, Sigma) και ω (O, Omega) (*Hayes et al., 2005, Oakley, 2011*). Όλες τους σχηματίζουν ομοδιμερή, αλλά υπάρχει και η δυνατότητα δημιουργίας ετεροδιμερών, αρκεί οι αλυσίδες να προέρχονται από την ίδια τάξη. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον δεκαέξι υπομονάδες κυτταροπλασματικών GSTs, και ενώ τα αλλοένζυμα της α και μ τάξης μπορούν να κάνουν ετεροδιμερή (*Hayes & Pulford, 1995*), ο συνδυασμός αυτών των υπομονάδων μπορεί να δώσει μεγάλο αριθμό ισοενζύμων.

Οι πιο συνηθισμένες και εκτενέστερα μελετημένες κυτταροπλασματικές GSTs από θηλαστικά ανήκουν στις τάξεις α (A, Alpha), μ (M, Mu) και π (P, Pi) (Dourado et al., 2008).

Γενικά δομικά χαρακτηριστικά για τις τρανσφεράσες γλουταθειόνης

Οι GSTs αποτελούν ομοδιμερή (δύο ίδιες υπομονάδες) ή ετεροδιμερή (δύο διαφορετικές υπομονάδες) ένζυμα και κάθε μονομερές διαθέτει δύο ενεργά κέντρα, μια G-θέση και μια H-θέση (Mannervik et al., 1978). Η G-θέση παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση για τη γλουταθειόνη και, συνεπώς, η αλληλουχία της παραμένει συντηρημένη σε όλες τις τάξεις. Η H-θέση, ωστόσο, η οποία αποτελεί την υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος, δεν είναι συντηρημένη και ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες GSTs και έτσι, πολλές ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις έχουν την δυνατότητα να προσδένονται με έναν όχι τόσο εξειδικευμένο τρόπο. Ως αποτέλεσμα, η δομή της H-θέσης καθορίζει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων για την συγκεκριμένη οικογένεια των GSTs (Johansson et al., 1998, Dourado et al., 2008). Η γενική δομική κατασκευή των υπομονάδων των ενζύμων αυτών περιλαμβάνει δύο περιοχές, την I και II. Η περιοχή I αποτελείται από μια α/β δομή από την πλευρά του N-τελικού άκρου με μια β -πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων ελασμάτων και τρεις έλικες ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), η οποία διαμορφώνει την θέση πρόσδεσης της γλουταθειόνης (G-θέση) και μια δεύτερη περιοχή προς το C-τελικό άκρο (περιοχή II) από α -έλικες ($\alpha 4$ - $\alpha 9$), η οποία διαμορφώνει το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής πρόσδεσης των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (H-θέση) (Armstrong, 1997, Josephy, 2010).

Γενική σημασία της τρανσφεράσης γλουταθειόνης στην έρευνα

Οι GSTs έλκουν το ενδιαφέρον στην έρευνα της φαρμακολογίας και της τοξικολογίας, καθώς αποτελούν στόχο φαρμάκων που προορίζονται για αντιασθματικές και αντικαρκινικές θεραπείες (Evans et al., 1991, Matsusita et al., 1998, Jakobsson et al., 1999b, Ruscoe et al., 2001). Είναι σημαντικό ότι έχουν την ιδιότητα να μεταβολίζουν παράγοντες χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων κατά του καρκίνου, καρκινογόνων ουσιών, εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων και παραπροϊόντων οξειδωτικού στρες. Η υπερέκφραση των GSTs σε κύτταρα όγκου θηλαστικών εμπλέκεται με την ανθεκτικότητα σε ποικίλους αντικαρκινικούς παράγοντες και χημικά καρκινογόνα (Hayes & Pulford, 1995). Επιπροσθέτως, υψηλά επίπεδα GSTs έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα και με την εκλεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα (Ranson et al., 2001, Edwards et al., 2004).

1.2. Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης και η συμβολή τους σε φυσιολογικές λειτουργίες

Όλοι οι οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε τοξικές χημικές ενώσεις. Η απειλή που εγείρεται εξαιτίας τέτοιων ενώσεων δεν αποτελεί πρόβλημα που προκλήθηκε από τη δράση της χημικής βιομηχανίας, τουναντίον υφίσταται από τις απαρχές της ζωής. Πολλές από τις τοξικές χημικές ενώσεις προέρχονται με φυσικό τρόπο από το περιβάλλον. Οι άνθρωποι μπορεί να καταναλώσουν έως και 1,5 g καθημερινώς από φυτοπροστατευτικές ενώσεις υπό τη μορφή φαινολικών, φλαβονοειδών γλυκοσινολιτών και σαπωνίνων (*Hayes & Pulford, 1995*).

Συγκεκριμένες φυσικές τοξίνες, συμπεριλαμβανομένων των αφλατοξινών από τη μούχλα, εστέρων φορβόλης και τοξινών πυρρολιδιζίνης, ανήκουν στις πιο δυνητικά καρκινογόνες και κλαστογόνες χημικές ενώσεις. Επιπροσθέτως, ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου, η ρίζα σουπεροξειδίου, που εμφανίζονται σαν αποτέλεσμα της αερόβιας αναπνοής, ακτινοθεραπείας και φλεγμονών, μπορεί να προκαλέσουν αυξημένο εύρος καρβονυλικών ενώσεων μέσω αλληλεπιδράσεων με μεμβρανικά λιπίδια και το DNA (*Hayes & Pulford, 1995*).

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης συμβάλλουν στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώσεων και, συνεπώς, στην προστασία του κυττάρου μέσω διαφόρων μηχανισμών. Ένας από αυτούς είναι η αποτοξίνωση μέσω του μονοπατιού του μερκαπτουρικού οξέος, καθώς η GST καταλύει το πρώτο από τα τέσσερα βήματα που απαιτούνται για τη σύνθεσή του (*Keen & Jakoby, 1978*). Όμως, μεταγενέστερες αντιδράσεις συνεπάγονται απομάκρυνση των ομάδων του γ-γλουταμινικού και της γλυκίνης από το σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη και στο τέλος N-ακετυλίωση του κυστεϊνικού συμπλόκου που προκύπτει, με αποτέλεσμα η GST να εμπλέκεται και πάλι, και συνεπικουρούμενη από τη συνθάση γλουταθειόνης, τη λιγάση γλουταμινικού και κυστεϊνης και ενζύμων μεταφορέων, με αποτέλεσμα την τελική απομάκρυνση των συμπλόκων από το κύτταρο (*Hayes & McLellan, 1999*). Επίσης, μεγάλος αριθμός εποξειδίων, όπως το αντιβιοτικό της φωσφομυκίνης, ετεροκυκλικών αμινών και αυτών που προέρχονται από καρκινογόνες ενώσεις του περιβάλλοντος αποτοξινώνονται από τις GSTs (*Coles et al., 2001, Hayes et al., 2005*).

Η συμπλοκοποίηση ξενοβιοτικών ενώσεων σχεδόν πάντα οδηγεί σε ενώσεις λιγότερο ενεργές, οι οποίες είναι έτοιμες να απεκκριθούν από τα κύτταρα. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, τα προϊόντα της δράσης της GST είναι περισσότερο ενεργά από τις αρχικές ενώσεις, όπως π.χ. μικρού μεγέθους αλκυλαλογονίδια που περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες (*Wheeler et al., 2001, Guengerich et al., 2003*).

Εκτός από τις δράσεις αυτές, οι GSTs συμβάλλουν και στο μεταβολισμό ενδογενών ενώσεων, όπως η αποτοξίνωση των προϊόντων του οξειδωτικού στρες. Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως του σουπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της ρίζας υδροξυλίου ($HO\cdot$), από το μερικώς ανηγμένο O_2 αποτελεί μια αναπόφευκτη συνέπεια της αερόβιας αναπνοής. Ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά κύριο λόγο από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και αντιδράσεις που καταλύονται από την 5-λιποξυγονάση, το κυτόχρωμα P450, την κυκλοοξυγονάση και την οξειδάση ξανθίνης (Hayes & McLellan, 1999). Βέβαια, οι ενεργές μορφές αποτελούν προϊόν εκμετάλλευσης από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης, της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης, αλλά και μη ενζυμικούς μηχανισμούς με τη δράση της α -τοκοφερόλης, του ασκορβικού οξέος, της γλουταθειόνης και της βιλιρουβίνης. Παρά τους μηχανισμούς αυτούς, όμως, οι ενεργές μορφές οξυγόνου βλάπτουν τις μεμβράνες λιπιδίων, το DNA, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα την οξείδωση των μακρομορίων αυτών και την παραγωγή κυτταροτοξικών και μεταλλαξιγόνων δευτερογενών μεταβολιτών (Marnett et al., 2003). Ενζυμικά συστήματα που περιλαμβάνουν τα ισοένζυμα της GST συμμετέχουν σε μηχανισμούς προστασίας των κυττάρων από τα παραπροϊόντα της οξειδωτικής καταπόνησης.

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης εμπλέκονται, επιπλέον, στην αποδόμηση των αρωματικών αμινοξέων (Fernández-Cañón & Peñalva, 1998), στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών (Johansson & Mannervik, 2001), στη βιοσύνθεση των φαρμακολογικώς σημαντικών μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (Hayes et al., 2005) και τη διαμόρφωση διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Hayes et al., 2005).

1.3. Τρανσφεράσες γλουταθειόνης και καρκίνος

Κατανομή των GSTs στα διάφορα υγιή όργανα

Στους φυσιολογικούς ιστούς, οι GSTs εκφράζονται παντού. Ωστόσο, κάθε όργανό διαθέτει ξεχωριστό υπόβαθρο για την έκφρασή τους, η οποία είναι πολύπλοκη, καθώς η κατανομή τους στους διαφόρους ιστούς ποικίλει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και το είδος (Hayes et al., 2005). Επίσης, υπάρχει διαφορά στην έκφραση των GSTs στην εμβρυϊκή ηλικία και στην ενήλικη φάση της ζωής ενός ατόμου. Για παράδειγμα, οι hGSTA1, hGSTA2 και hGSTM1 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα καθόλη τη ζωή ενός ατόμου. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης της hGSTP1 είναι υψηλότερα σε όλα τα όργανα του εμβρύου, τα οποία και ελαττώνονται στο τέλος της προγεννητικής περιόδου (Raijmakers et al., 2001).

Η ρύθμιση της έκφρασης των GSTs φαίνεται να είναι διαφορετική σε κάθε ιστό και κυτταρικό τύπο. Ο **Πίνακας 1** παρουσιάζει την κατανομή μερικών GSTs σε ιστούς.

Πίνακας 1: Κατανομή των GSTs στον άνθρωπο (*Singh, 2014*)

Ισοένζυμο	Ιστοί/Όργανα
hGSTP1	στόμαχος, εγκέφαλος > πνεύμονες, πλακούντας > νεφροί, πάγκρεας
hGSTA1	ήπαρ > νεφροί, επινεφρίδια > πάγκρεας, δωδεκαδάκτυλος
hGSTA2	ήπαρ, πάγκρεας > νεφροί, δωδεκαδάκτυλος
hGSTA3	ωοθήκες, όρχεις, επινεφρίδια, πλακούντας
hGSTA4	σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα όργανα
hGSTM1	ήπαρ > όρχεις > εγκέφαλος
hGSTM2	εγκέφαλος > όρχεις > καρδιά
hGSTM3	όρχεις > εγκέφαλος
hGSTO1	ήπαρ, καρδιά
hGSTO2	όρχεις
hGSTT1	νεφροί, ήπαρ > λεπτό έντερο > εγκέφαλος
hGSTT2	ήπαρ

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ένζυμο της hGSTP1, καθώς είναι αυτό που μελετάμε στην παρούσα εργασία. Γενικώς, η hGSTP1 φαίνεται να είναι σε υψηλότερα επίπεδα σε διαιρούμενα (πολλαπλασιαζόμενα) κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα. Παράδειγμα αποτελεί η ασθένεια της ερυθρολευχαιμίας, όπου κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων εκφράζεται κυρίως η hGSTP1, ενώ με την έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων τα επίπεδα της hGSTP1 αντικαθίστανται βραδέως από αυτά της hGSTA1 (*Schnekenburger et al., 2006*).

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης στον καρκίνο

Ο καρκίνος είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με αναφορές του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας έχουμε 7,6 εκατομμύρια θανάτους και 12,4 εκατομμύρια νέα περιστατικά εμφάνισης καρκίνου κάθε χρόνο (*Doyle & Levin, 2008*). Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν παράσχει σύνδεση της πολυμορφικής έκφρασης των GSTs με την πρόγνωση και εμφάνιση καρκίνου αν και, μερικές φορές, τα δεδομένα είναι κατακερματισμένα και ανακριβή (*McIlwain et al., 2006*). Οι GSTs της τάξης π αποτελούν τα περισσότερα μελετημένα ισοένζυμα στον ανθρώπινο καρκίνο και η κατανομή τους σε καλοήθεις ιστούς είναι περισσότερο εκτενής από τα ισοένζυμα της α τάξης (*Sundberg et al., 1993*). Επίσης, μελέτες για τα ισοένζυμα της α και μ τάξης έδειξαν έκφραση σε 29% και 41% των καρκίνων αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψιν

ότι δεν υπήρχε αναστολογική αντίδραση για GST της π τάξης (*Murray et al., 1995, Bostwick et al., 2007*).

Τα επίπεδα έκφρασης ως προς τη GST δύνανται να είναι προγνωστικά από την συμπτωματολογία του ασθενούς π.χ. σε κύτταρα καρκινώματος στους νεφρούς η χρώση για τη hGSTP1 μπορεί να είναι παρόμοια με του διπλανού καλοήθους νεφρικού φλοιού 19 ή απύουσα, με την τελευταία περίπτωση να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα ως προς την πρόγνωση (*Grignon et al., 1994*). Στον καρκίνο του μαστού η έκφραση της hGSTP1 είναι αντιστρόφως ανάλογη του είδους του καρκίνου (*Cairns et al., 1992*). Επίσης, άλλες ομάδες ερευνητών ανακάλυψαν ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της π τάξης των GSTs αποτέλεσαν δυσμενή προγνωστική ένδειξη για τον μη μεταστατικό στους λεμφαδένες καρκίνο του μαστού, γεγονός μεγαλύτερης σημασίας από το μέγεθος του όγκου, του καθεστώτος των ορμονικών υποδοχέων και του πυρηνικού βαθμού σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις (*Gilbert et al., 1993*).

Γενικά, οι GSTs έχει παρατηρηθεί σε μελέτες *in vitro* και *in vivo* να υπερεκφράζονται σε μεγάλο εύρος νεοπλασματικών κυττάρων (*Oguztuzun et al., 2011*). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι GSTs εμπλέκονται στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι φαρμακευτικών σκευασμάτων, καταλήγοντας στην πιθανή αξιοποίηση των ενζύμων αυτών σαν πρωτεϊνικούς δείκτες για τον καρκίνο, με την περισσότερη έμφαση να δίνεται στην hGSTP1, καθώς είναι το πιο διαδεδομένο και άφθονο ισοένζυμο και η έκφρασή του συνδέεται με την ανάπτυξη και αντίσταση των όγκων έναντι διαφόρων αντικαρκινικών φαρμάκων (*Singh, 2014*).

Τάξεις ισοενζύμων που εμφανίζονται σε περιπτώσεις καρκίνου

Τάξη π

Ο γονότυπος του ισοενζύμου της hGSTP1 έχει συνδεθεί με διαφορές στη χημειοθεραπευτική απόκριση και στην επιδεκτικότητα του καρκίνου και υπερεκφράζεται σε μεγάλη ποικιλία όγκων συμπεριλαμβανομένων των όγκων των ωοθηκών, του μαστού, του παχέος εντέρου (κόλον), του παγκρέατος, του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του λεμφώματος (*Townsend & Tew, 2003, Dourado et al., 2008, Di Pietro et al., 2010*). Επίσης, πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε αυξημένος αριθμός ατόμων με όγκο των όρχεων ομοζυγωτικών ως προς το αλλοένζυμο hGSTP1*B σε μελέτη των *Kraggerud et al., 2009*. Παρόμοια, τα αλλοένζυμα hGSTP1*C και hGSTP1*D βρέθηκαν να είναι κυρίαρχα σε κακοήθη κύτταρα γλοιομάτων (*Yao et al., 2012, Xie et al., 2014*).

Παράλληλες μελέτες έδειξαν αυξημένα επίπεδα για το hGSTP1 σε μεγάλο εύρος κυτταρικών σειρών, ανθεκτικών σε ποικίλους χημικούς παράγοντες. Στη συνέχεια, ερευνητικές αναφορές στον άνθρωπο με πειράματα *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι αυξημένη έκφραση της hGSTP1 παρατηρήθηκε σε διάφορους τύπους όγκων και ότι τόσο υψηλά επίπεδα έκφρασης ήταν άρρηκτα συνδεδεμένα με επιθετικούς τύπους όγκων προσδίδοντας ελαττωμένο προσδόκιμο ζωής του ασθενούς, καθώς και ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Εξαιρεση με ενδιαφέρον αποτελεί η παντελής απουσία της hGSTP1 στον καρκίνο του προστάτη, λόγω υπερμεθυλίωσης του προαγωγέα της hGSTP1 (Lovrić *et al.*, 2010).

Τάξη α

Η έκφραση των αλλοενζύμων του hGSTA1 (hGSTA1*A, hGSTA1*B) έχει συνδεθεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού και του στομάχου (Ahn *et al.*, 2006, Economopoulos & Sergeantanis, 2010, van Nguyen *et al.*, 2010). Από έρευνα των Maekawa *et al.*, 2011, φάνηκε συσχετισμός μεταξύ του αλλοενζύμου hGSTA1*B και της εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Ωστόσο, από προηγούμενη έρευνα που έλαβε χώρα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, εντοπίστηκε ένα πλεονέκτημα όσον αφορά τις πιθανότητες επιβίωσης για τα άτομα που έφεραν τον αλληλόμορφο B του ενζύμου (Martinez *et al.*, 2008).

Τάξη μ

Τα ισοένζυμα μ των GSTs που έχουν ταυτοποιηθεί είναι πέντε (hGSTM1-5) (Singh, 2014). Το γονίδιο της GSTM1 διαθέτει τέσσερις αλληλομόρφους, επιτρέποντας την εμφάνιση αρκετών πολυμορφισμών συμπεριλαμβανομένου και του μηδενικού φαινοτύπου (hGSTM1*0) (Townsend & Tew, 2003). Ο συγκεκριμένος φαινότυπος, ο οποίος δεν δίνει λειτουργική πρωτεΐνη, σχετίζεται με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του στομάχου και του τραχήλου της μήτρας (Carlsten *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2011). Επιπλέον, ο γονότυπος της hGSTM3*AB συσχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στην κεφαλή και στην ευρύτερη περιοχή του λαιμού και, σε συνέργεια με τη hGSTM1*AB, έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει συχνότερα σε ασθενείς με καρκίνο των πλακωδών κυττάρων (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα) (Fryer *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2014).

Τάξη θ

Η θ τάξη των GSTs αποτελείται από δύο διαφορετικές υποοικογένειες (hGSTT1, hGSTT2) και πολυμορφισμοί υπάρχουν μεταξύ των δύο γονιδίων (Townsend & Tew, 2003). Η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας της hGSTT1 αποδίδεται στην ομόζυγη διαγραφή του γονιδίου έχοντας σαν τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση του αλλοτύπου hGSTT1*0, ο οποίος ευθύνεται για μειωμένη καταλυτική δράση και έχει συσχετιστεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκί-

νου της κεφαλής, της περιοχής του λαιμού και της παρειακής κοιλότητας (*Anantharaman et al., 2007, Zhang et al., 2012*).

Τρανσφεράσες γλουταθειόνης: επιβίωση και πρόγνωση του καρκίνου

Η αποσιώπηση των γονιδίων των hGSTM1 και hGSTT1 έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός «μηδενικού» γονοτύπου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από απώλεια της ενζυμικής δράσης. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει τους «μηδενικούς γονότυπους» των hGSTT1 και hGSTM1 με την έκβαση της αντικαρκινικής θεραπείας. Άτομα ομοζυγωτικά για αυτές τις αποσιωπήσεις θεωρείται ότι ευρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών σαν απόρροια της μειωμένης ικανότητας αποτοξίνωσης πιθανών καρκινογόνων ενώσεων (*Singh, 2014*). Σε άλλη έρευνα φάνηκε να υπάρχει πλεονέκτημα ως προς την επιβίωση των ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του μαστού και λαμβάνουν, κατά τα πρώτα στάδια της νόσου, χημειοθεραπευτικά σκευάσματα ή ακτινοθεραπεία, έχοντας το «μηδενικό φαινότυπο» είτε για τη hGSTM1 είτε για τη hGSTT1 (*de Aguiar et al., 2012*).

Σε άτομα με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η παρουσία οποιουδήποτε από τους δύο «μηδενικούς» γονοτύπους, δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα στην εφαρμογή της θεραπείας, ενώ ο συνδυασμός της παρουσίας των δύο εν λόγω γονοτύπων συσχετίστηκε με ελαττωμένες πιθανότητες επιβίωσης (λιγότερο από 42 μήνες ζωής) (*Howells et al., 1998, Settheetham-Ishida et al., 2009*). Ασθενείς με χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και οξεία μυελοειδή λευχαιμία παρουσιάζουν συσχέτιση με την εμφάνιση των αλλοτύπων hGSTM1*0 και hGSTT1*0 (*Dunna et al., 2013*). Περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης παρατηρήθηκαν σε γυναίκες που έφεραν τους τρεις γονοτύπους GSTs (μηδενικά hGSTM1 και hGSTT1, hGSTP1*B) σε σύγκριση με άτομα που έφεραν μόνο τα δύο μη λειτουργικά ένζυμα (*Nagle et al., 2007*).

1.4. Δομικές και λειτουργικές διαφορές των τρανσφερασών γλουταθειόνης στον καρκίνο

Πιο πάνω αναφέρθηκαν κυρίως τέσσερις τάξεις GSTs, οι οποίες και εμφανίζονται στους διαφόρους τύπους καρκίνου. Αυτές είναι οι τάξεις α, π, μ και θ. Η τάξη θ είναι διακριτή από τις υπόλοιπες τρεις από πλευράς αλληλουχίας, δομής και καταλυτικής δράσης (*Sheehan et al., 2001*). Εξελικτικά, επίσης, είναι πολύ απομακρυσμένη από τις υπόλοιπες τάξεις (α, μ, π) και πιθανώς απέκλινε από το κοινό προγονικό γονίδιο των άλλων τάξεων πριν το διαχωρισμό των φυτών και των ζώων. Η τάξη θ ευρίσκεται στα φυτά, ενώ οι GSTs των τάξεων μ, π και α απουσιάζουν (*Dixon et al., 2009*).

Η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος των GSTs της α τάξης είναι πιο αποδοτική στην χρήση μικρών και υδρόφοβων μορίων όπως π.χ. το HNE (4-Hydroxynonenal, κύριο προϊόν του καταβολισμού των λιπιδίων) (Carini et al., 2004). Το παραπάνω εξηγείται από το γεγονός της ύπαρξης μιας επιπλέον έλικας στην περιοχή II (έλικα $\alpha 9$), η οποία διαμορφώνει την Η-θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (Kuhnert et al., 2005). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι ανάμεσα στις GSTs του ανθρώπου, η hGSTA1 έχει τη μεγαλύτερη καταλυτική δραστικότητα σύζευξης της GSH με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, που χρησιμοποιούνται στη συνδυαστική θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Dirven et al., 1994).

Στην τάξη μ , όπως και στην π , απουσιάζει η $\alpha 9$ έλικα με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερο και ευρύτερο ενεργό κέντρο συγκρινόμενο με την α τάξη. Αυτό συνάδει με το γεγονός ότι ο κατάλογος των υποστρωμάτων των GSTs της μ τάξης περιλαμβάνει πολλές και ογκωδέστερες ενώσεις, όπως τα εποξειδία αφλατοξίνης B1 κ.ά. Οι GSTs της μ τάξης διαθέτουν έναν «βρόγχο μ », ο οποίος πλαισιώνεται από μια β -πτυχωτή επιφάνεια ($\beta 2$) και μια έλικα ($\alpha 2$) στο N-τελικό άκρο, επιτρέποντας τη δημιουργία ενός βαθύτερου ενεργού κέντρου. Στις GSTs της μ τάξης, στον άνθρωπο, η πιο αποδοτική σαν βιολογικός καταλύτης είναι η hGSTM1 με ποικίλα υποστρώματα (Comstock et al., 1994).

Γενικότερα, τα ενεργά κέντρα των GSTs της τάξης θ είναι πιο διακριτά. Στις τάξεις α - π - μ , υπάρχει συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης (θέση 7) κοντά στο N-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας του ενζύμου, που σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης στη G-θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, ενώ στην τάξη θ η αντίστοιχη τυροσίνη αντικαθίσταται από σερίνη (Armstrong, 1997, Tars et al., 2006). Όσον αφορά την Η-θέση πρόσδεσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος παρατηρούνται μεγάλες διαφορές ως προς το σχήμα και το χημικό χαρακτήρα μεταξύ των τάξεων (Oakley, 2011).

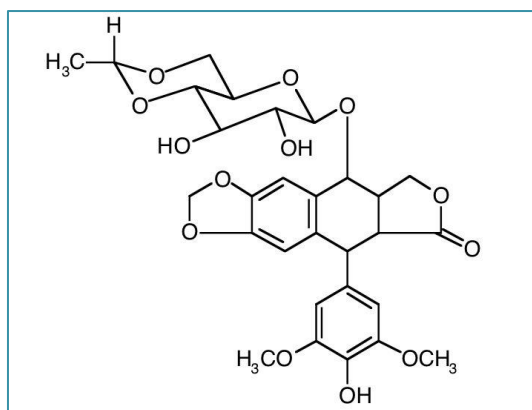
Οι αλληλεπιδράσεις, στο μεσοδιάστημα των δύο υπομονάδων των διμερών, είναι κυρίως υδροφοβικές μεταξύ των αμινοξέων της περιοχής I από την μια υπομονάδα και εκείνων της περιοχής II της άλλης υπομονάδας. Ακολουθείται, σε γενικές γραμμές, ένα μοτίβο «κλειδιού – κλειδαριάς» (Sinning et al., 1993).

1.5. Υποψήφια φάρμακα – αναστολείς των τρανσφερασών γλουταθειόνης στον καρκίνο

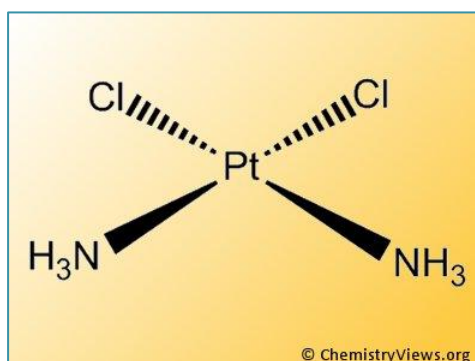
Μέλη της μεγάλης οικογένειας των GSTs είναι σημαντικά για τους μηχανισμούς της κυτταρικής άμυνας. Σημαντικοί πολυμορφισμοί στις GSTs συνδέονται με αλλαγές στην ενζυμική δραστικότητα, στην ευαισθησία έναντι στη χημειοθεραπεία και κυρίως στην επιβίωση του ασθενούς. Στη μεταγονιδιωματική εποχή που διαβιούμε, η δυνατότητα εξατομίκευσης της θεραπείας

του καρκίνου κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος. Η ανθεκτικότητα έναντι της χημειοθεραπείας και της τοξικότητας εξειδικευμένων παραγόντων έχει προσδιοριστεί ευρέως από πολυποίκιλα ενζυμικά συστήματα, τα οποία αποτελούν κυτταροτοξικούς στόχους ή μέλη του μεταβολικού μονοπατιού του χορηγηθέντος φαρμάκου (Nebert, 1997, Evans & Relling, 1999, Pullarkat et al., 2001).

Συνεπώς, είναι ζωτικής σημασίας η ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων, τα οποία είτε από μόνα τους είτε σε συνδυασμό με άλλα θα έχουν την ικανότητα της καταπολέμησης του φαινομένου της ανθεκτικότητας των GSTs έναντι ποικίλων φαρμάκων (multidrug resistance). Ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, ο πιο συχνά συναντώμενος στα καρκινικά κύτταρα είναι η επαγωγή και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών μεταφοράς και απέκκρισης. Σχετικά παραδείγματα τέτοιων μηχανισμών ανθεκτικότητας αποτελούν το σύστημα πρωτεϊνών μεταφοράς μέσω της σύνδεσης με ATP (π.χ. η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, Pgp), το σύστημα της MRP1 (Multi-drug Resistance associated – Protein 1) και της BCRP (Breast Cancer Resistance – Protein) (Szakács et al., 2006). Ένας επιπλέον τρόπος απόκτησης ανθεκτικότητας σε πολλά αντικαρκινικά φάρμακα είναι οι ελιγμοί των μορίων στόχων, όπως οι μεταλλαγές της τοποϊσομεράσης II ενάντια στην προσπάθεια αναστολής της με χρήση φαρμακευτικών ενώσεων όπως η ετοποσιδή (Etoporphos) (Εικόνα 1) (Pommier et al., 1994).



Εικόνα 1: Χημική δομή της ετοποσιδής.



Εικόνα 2: Η δομή της σισπλατίνης (cisplatin).

σισπλατίνη (Chu, 1994).

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να καθίστανται ανθεκτικά λόγω της ενισχυμένης επιδιορθωτικής ικανότητας του DNA. Παράδειγμα τέτοιου φαινομένου αποτελούν οι ανθεκτικές στην σισπλατίνη (cisplatin) (Εικόνα 2) κυτταρικές σειρές, που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα επιδιόρθωσης του DNA και οι οποίες μετρήθηκαν μέσω της απώλειας των εγκλεισμάτων λευκόχρυσου (platine), της σύνθεσης του επιδιορθωμένου DNA και την επαναδραστηριοποίηση του πλασμιδιακού DNA που καταστράφηκε από την σισπλατίνη

Αλλαγές σε γονίδια που είναι ιδιαίζουσας σημασίας για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση έχουν παρατηρηθεί σε ανθεκτικούς όγκους. Η διαγραφή ή μεταλλαγή του p53 καταστολέα σε όγκους είναι υπεύθυνη για την πολύπλευρη ανθεκτικότητα σε φάρμακα που έχει

παρατηρηθεί σε καρκινικές σειρές (Sigal & Rotter, 2000). Τα καρκινικά κύτταρα δύνανται, επίσης, να εμφανίσουν αντοχή μέσω της υπερέκφρασης ενζύμων που μπορεί να αυξήσουν την αποτοξίνωση και να παρακάμψουν την κυτταροτοξική δράση των αντικαρκινικών σκευασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πολλοί αλκυλιωτικοί παράγοντες στην θεραπεία κατά του καρκίνου έχει φανεί ότι αποτελούν υποστρώματα των GSTs (Dirven et al., 1996), καθώς και η υπερέκφραση των GSTs με ταυτόχρονη υψηλή συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) σε καρκινικούς όγκους συνδέεται με την ανάπτυξη και έκφραση ανθεκτικότητας σε φάρμακα (Townsend & Tew, 2003).

Σαν αποτέλεσμα των παραπάνω, η καταλυτική δράση των GSTs ίσως να παίζει ρόλο στην αποτοξίνωση ποικίλων αντικαρκινικών φαρμάκων όπως η χλωραμβουκίλη (Black et al., 1990, Horton et al., 1999), η κυκλοφωσφαμίδη (Berhane & Mannervik, 1990, Dirven et al., 1996), η μελφαλάνη (Dulik et al., 1986), η καρμουστίνη (Smith et al., 1989), η σισπλατίνη (Ishikaw & Ali-Osman, 1993), η βουσουλφάνη (Gibbs et al., 1996), η θειοτέπα (Cnubben et al., 1998), η ιφωσφαμίδη (Dirven et al., 1995) και η μιτοξανθρόνη (Wolf et al., 1986, Blanz et al., 1991). Βέβαια, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η υπερέκφραση των GSTs σε καρκινικά κύτταρα ίσως να είναι υπεύθυνη και για την αποτοξίνωση ενώσεων που δεν είναι υποστρώματα των εν λόγω ενζύμων, όπως για την ένωση ετοποσίδη που αναφέρθηκε ανωτέρω ή τη δοξορουβικίνη (Εικόνα 6) (Gaudiano et al., 2000, Townsend & Tew, 2003).

Σχεδόν πενήντα διαφορετικοί τύποι χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι διαθέσιμοι για την αντιμετώπιση διακοσίων περίπου διαφορετικών ειδών καρκίνου. Εξαιτίας της έλλειψης εκλεκτικής αποτελεσματικότητας, η χρήση των συγκεκριμένων σκευασμάτων συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες με αποτέλεσμα τη βλάβη και υγιών οργάνων του ασθενούς (Kibria et al., 2014).

Στρατηγική της υπερνίκησης της πολυσχιδούς ανθεκτικότητας έναντι αντικαρκινικών φαρμάκων

Στον απόηχο των παραπάνω πληροφοριών, η αναζήτηση μορίων ικανών να αναστέλλουν τις GSTs και/ή τους μηχανισμούς εξόδου των φαρμακευτικών ενώσεων από τα κύτταρα έχει καταστεί ένας από τους πρωταρχικούς στόχους της σύγχρονης έρευνας στην προσπάθεια της διαχείρισης της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων παρόλη τη χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων (Sau et al., 2010).

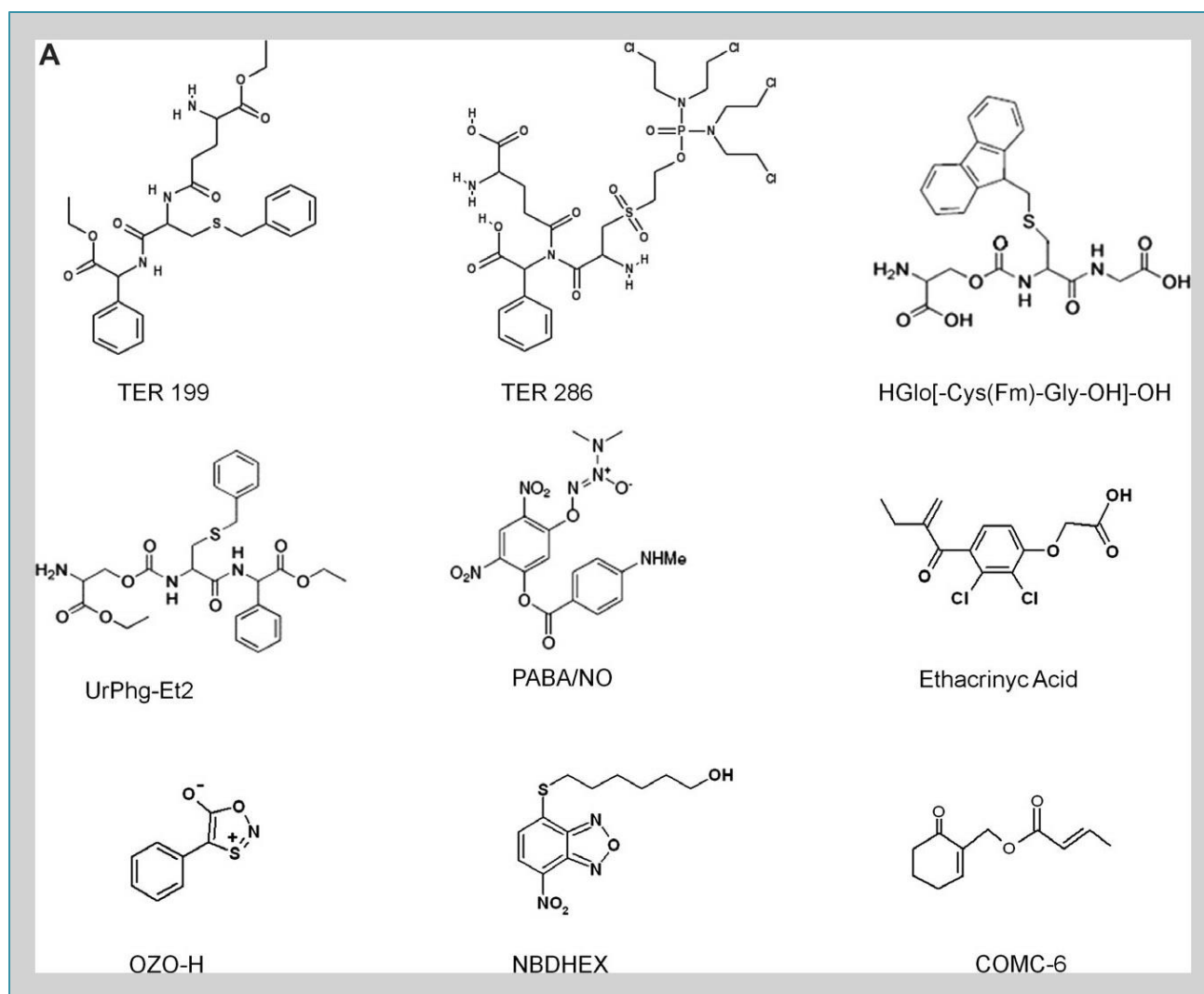
Από τους πρώτους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκεκριμένες GSTs αποτελεί το αιθακρυνικό οξύ (Εικόνα 3), μια δραστική ένωση που χρησιμοποιείτο ως διουρητικό. Παρόλο που αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα μερικών ισοενζύμων των GSTs, η ίδια ένωση αποτε-

λεί αναστολέα των ενζύμων αυτών και γι' αυτό το λόγο έχει χρησιμοποιηθεί για να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στην κυτταροτοξική δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων όπως η μελφαλάνη, η καρμουστίνη και η μιτομυκίνη C και σε λιγότερο βαθμό η χλωραμβουκίλη. Ωστόσο, σημαντικές παρενέργειες, όπως η έντονη διούρηση, έχουν αποθαρρύνει τη χρήση του μορίου αυτού στην κλινική εφαρμογή (*Tew et al., 1997*).

Ιδιαίτερη μνεία γίνεται και στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στις αντικαρκινικές ουσίες μέσω του σχεδιασμού και σύνθεσης αναλόγων της γλουταθειόνης με σκοπό την αναστολή των υπερεκφραζομένων GSTs σε καρκινικά κύτταρα. Περισσότερες πληροφορίες αναφέρονται σε επόμενη παράγραφο (*Παράγραφος §1.6*).

Αναστολείς των τρανσφερασών γλουταθειόνης μη αναγνωρίσιμοι από τους ABC μεταφορείς

Αρκετά καινούρια αντικαρκινικά φάρμακα απορρίπτονται από τα καρκινικά κύτταρα μέσω του συστήματος διαμεμβρανικών μεταφορέων με χρήση ATP (ABC μεταφορείς). Για την ανατροπή του φαινοτύπου ανθεκτικότητας γίνεται χρήση χημειορρυθμιστικής ένωσης, η οποία αναστέλλει τη λειτουργία της σχετιζόμενης με την ανθεκτικότητα πρωτεΐνης (*Szakács et al., 2006*). Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι η αντικατάσταση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του γ-γλουταμινικού οξέος και της κυστεΐνης με ισοεστέρα ουρεθάνης στο μόριο της γλουταθειόνης συνθέτει έναν αποδοτικό συναγωνιστικό αναστολέα της MRP1. Συνεπώς, ο ισοεστέρας ουρεθάνης της γλουταθειόνης μπορεί να χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη αναστολέων των MRP (*Burg et al., 2002*).



Εικόνα 3: Ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας σε μεγάλο εύρος φαρμάκων, η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση των τρανσφερασών γλουταθειόνης (*Sau et al., 2010*).

Μια εναλλακτική στρατηγική παράκαμψης μπορεί να υλοποιηθεί με τη χρήση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που δεν είναι υποστρώματα των ABC μεταφορέων ή έχουν αυξημένο λόγο εισρών λόγω της υψηλής λιποφιλικότητας. Για παράδειγμα, υψηλής λιποφιλικότητας ανάλογα ανθρακυκλίνης έδειξαν ότι προκαλούν σημαντικό ποσοστό μείωσης στη δράση της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp) στην οξεία μυελοειδή λευχαιμία που παρουσιάζουν πρωτογενή ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα (*Szakács et al., 2006*). Άλλο παράδειγμα αναστολέα των GST αυτών αποτελεί η ένωση NBDHEX (**Εικόνα 3**), παράγωγο της 7-νιτρο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλης, η οποία διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, δεν αναγνωρίζεται από τα αντίστοιχα ένζυμα μεταφοράς εκτός των κυττάρων και επιφέρει ικανοποιητική αντινεοπλασματική δράση (*Ricci et al., 2005, Turella et al., 2006, Ascione et al., 2009*). Σημαντικό χαρακτηριστικό

της ένωσης αυτής είναι ότι δεν αποτελεί πεπτιδομιμητικό αναστολέα της γλουταθειόνης, αλλά προσδέεται στην Η-θέση (υδρόφοβη) πρόσδεσης του υποστρώματος της hGSTP1 και επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα με τις πεπτιδομιμητικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με την G-θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (*Federici et al., 2009*).

Προφαρμακευτικές ενώσεις

Μια διαφορετική τάξη φαρμάκων αποτελούν κυτταροτοξικοί παράγοντες, που εκμεταλλεύονται την καταλυτική δράση των GSTs για να επιτύχουν την ενεργοποίησή τους. Αυτά τα προφάρμακα είναι ξεχωριστά λόγω της εκλεκτικότητάς τους σε ποικιλία ισοενζύμων και των πολυάριθμων ενεργών παραγόντων που προέρχονται από αυτά (*Sau et al., 2010*).

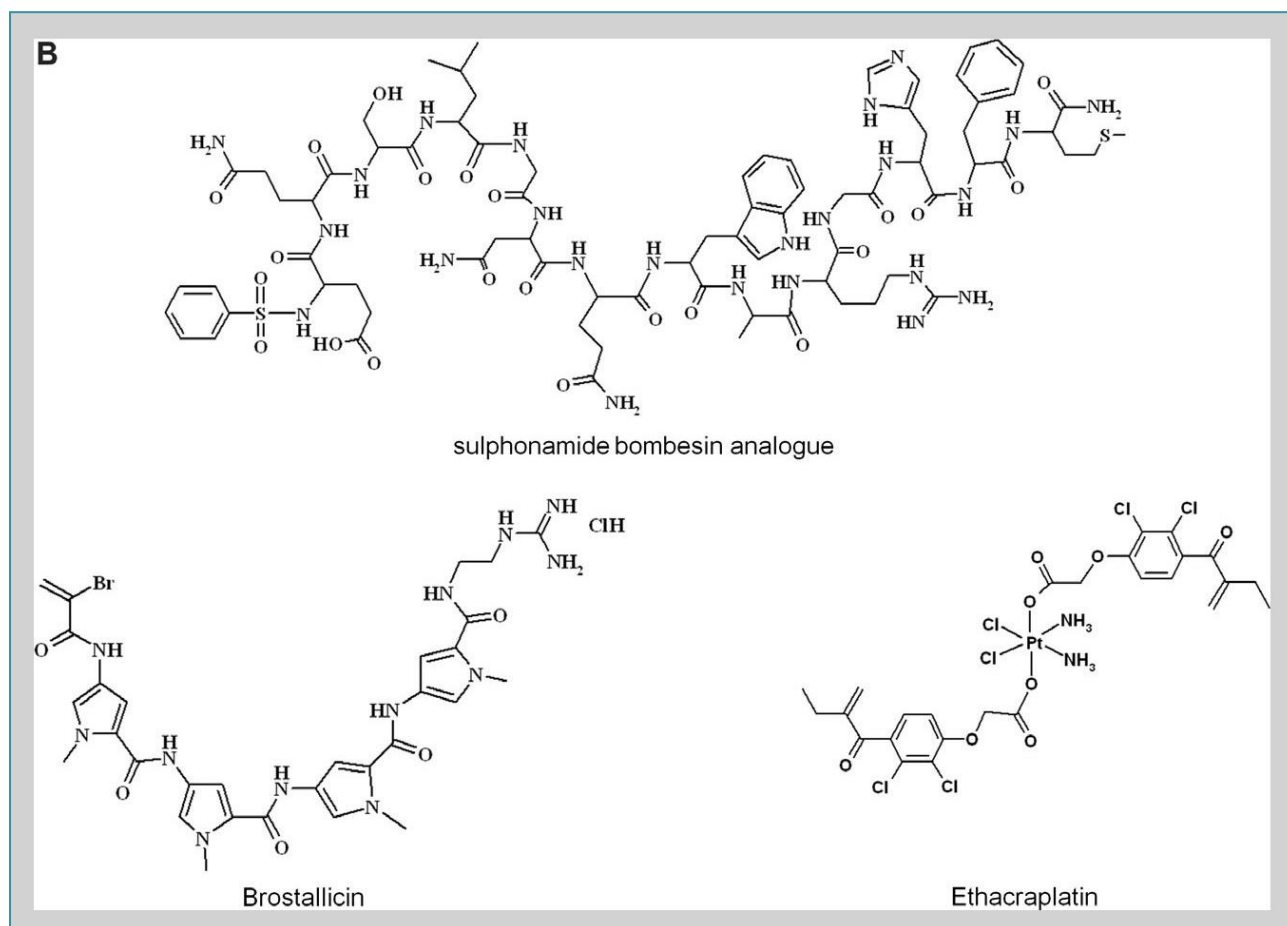
Παράδειγμα τέτοιας ένωσης αποτελεί η συνθετική ένωση PABA/NO([O²-{2,4-δινιτρο-5-[4-(N-μεθυλαμινο)βενζοϋλοξυ]φαινυλο}1-(N,N-διμεθυλαμινο)διαζεν-1-ιο-1,2-διολικό]), ένα προφάρμακο ικανό να απελευθερώνει κυτταροτοξικές ποσότητες οξειδίου του αζώτου (NO) (*Εικόνα 3*) (*Findlay et al., 2004*). Πιο συγκεκριμένα σχεδιάστηκε κατά τρόπο τέτοιο, ώστε να απελευθερώνει αποδοτικότερα NO όταν μεταβολίζεται από το ισοένζυμο hGSTP1 παρά από άλλες GSTs (*Ji et al., 2008*). Ωστόσο, μελέτες απέδειξαν ότι απομακρύνεται από τα κύτταρα μέσω της MRP1, και ιδιαίτερα όταν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη υπερεκφράζεται (*Findlay et al., 2004*). Επιπλέον, η ένωση αυτή παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα και υδρολύεται κατά αυθόρμητο τρόπο (*Sau et al., 2010*).

Μια άλλη ένωση είναι η OZO (4-αρυλ-1,3,2-οξαθειαζολυλιο-5-ολικό) (*Εικόνα 3*), της οποίας οι παράγωγοι ενώσεις είναι -ανάλογα με το pH- δότες οξειδίων του αζώτου (NO) (*Cui et al., 2008*). Η αντίδραση με αυτή την ένωση προκαλεί ακαριαία και ολοκληρωτική απώλεια της λειτουργίας των GSTs, καθώς και ενεργοποίηση της διαδικασίας απόπτωσης των κυττάρων. Έχει, επίσης, προταθεί ότι τα παράγωγα της ένωσης αυτής, κυρίως η OZO-H, αποτελεί το αποτέλεσμα της αναστολής των GSTs. Ένας πιθανός μηχανισμός της αναστολής που επιχειρεί να εξηγήσει το φαινόμενο αναφέρει ότι ενδοκυτταρικά ιόντα σιδήρου μαζί με τη γλουταθειόνη ίσως να αλληλεπιδρούν αυθόρμητα με δύο μόρια NO παράγοντας ένα δινιτροσυλο-διγλουταθειόνυλο σύμπλοκο σιδήρου (DIDGIC), μια ένωση που αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα που βρέθηκε ποτέ για τις GSTs (*Cesareo et al., 2005, Pedersen et al., 2007*).

Ακόμα, διάφορα ανάλογα βομβεσίνης ενώθηκαν με βενζολοσουλφόνυλο ομάδα, εκμεταλλευόμενοι την πεπτιδυλομάδα της βομβεσίνης, η οποία αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από τον ομώνυμο υποδοχέα που τοποθετείται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η εισαγωγή του φαρμάκου εντός του κυττάρου. Εντός του καρκινικού κυττά-

ρου, η hGSTA1 αλληλεπιδρά με την εισηγμένη ένωση και τη γλουταθειόνη δημιουργώντας σύμπλοκο που δρα σαν συναγωνιστικός αναστολέας των GSTs (Axarli et al., 2009).

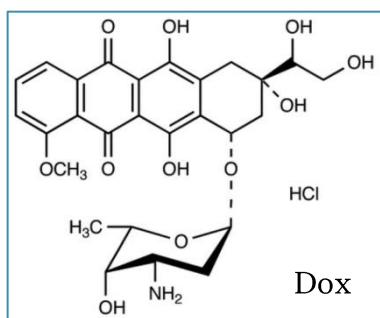
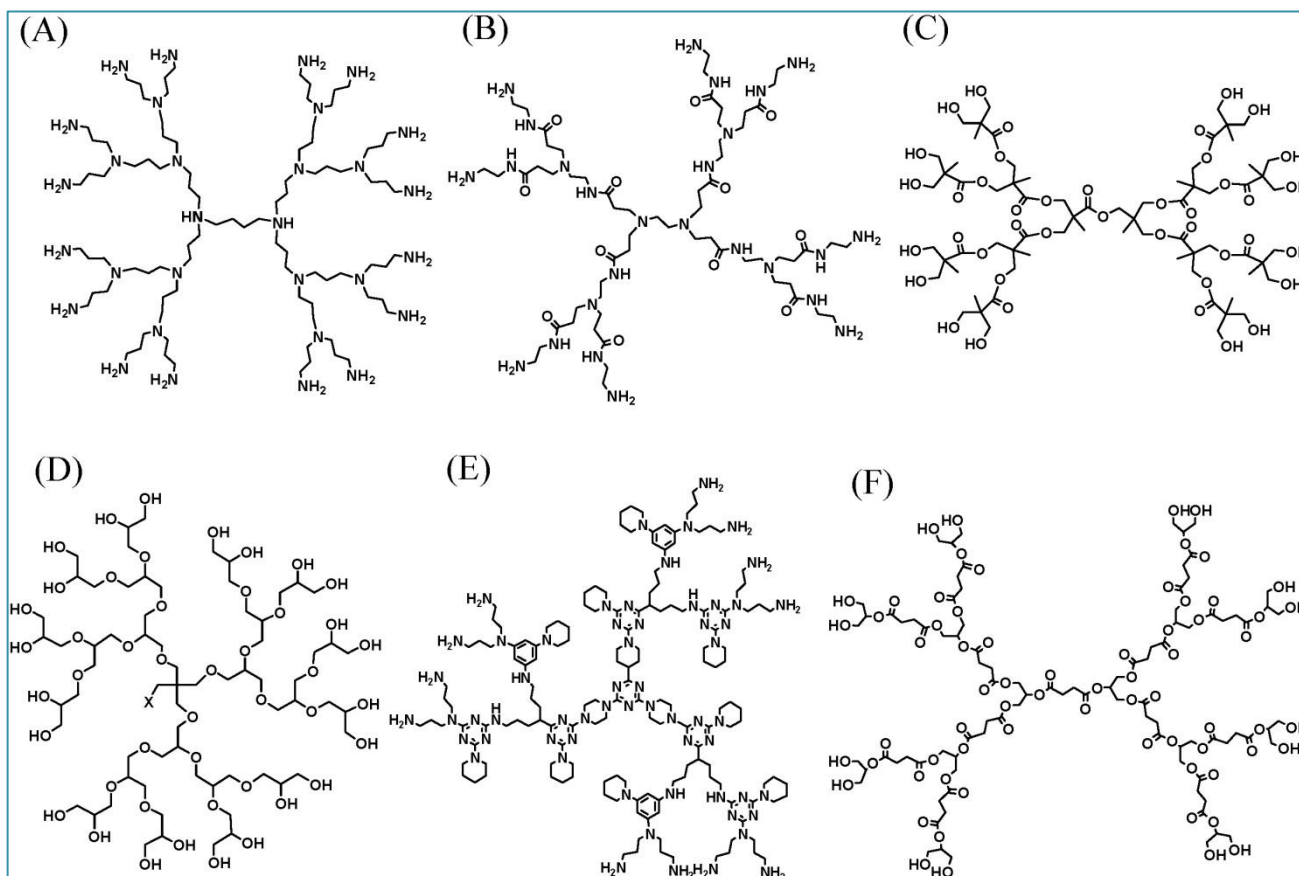
Άλλη τάξη προφαρμάκων περιλαμβάνει αλκυλιωτικούς παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται και πάλι μέσω GSTs, όπως είναι η TER286 (Vergote et al., 2009), η COMC (Hamilton et al., 2003), η μπροσταλλισίνη (Lorusso et al., 2009, Pezzola et al., 2010) και η αιθακραπτατίνη (δύο μόρια αιθακρυνικού οξέος σε σύμπλοκο με λευκόχρυσο IV) (Ang et al., 2005).



Εικόνα 4: Ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας σε μεγάλο εύρος φαρμάκων, η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση των τρανσφερασών γλουταθειόνης (Sau et al., 2010).

Όταν η TER286 (**Εικόνα 3**) αντιδρά με ισοένζυμα των τάξεων α και μ , η λανθάνουσα κυτταροτοξίνη απελευθερώνει ανάλογο κυκλοφωσφαμιδίου με εγγενή κυτταροτοξική δράση. Η ένωση αυτή σαν φάρμακο έχει δώσει αποτελέσματα σε μεγάλο εύρος όγκων και έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλαπλών κλινικών δοκιμών σε προχωρημένους καρκίνους (Vergote et al., 2009). Στην περίπτωση της μπροσταλλισίνης, τα υψηλά επίπεδα GSH και GSTs έχουν ρόλο κλειδί στη κυτταροτοξικότητά της. Οι GSTs των τάξεων π και μ καταλύουν την πυρηνόφιλη αντίδραση προσθήκης *Michael* με την προσθήκη γλουταθειόνης στην ακρυλάμιδο-ομάδα της μπροσταλλι-

σίνης (Εικόνα 4). Συνεπώς, η μπροσταλλισίνη δεν αποτοξινώνεται από τις GSTs στο κύτταρο και δίνεται έτσι η δυνατότητα χρήσης για θεραπεία σε όγκους που υπερεκφράζουν τις GSTs των μ και π τάξεων (Lorusso et al., 2009, Pezzola et al., 2010).



Εικόνες 5 & 6: Παραδείγματα πολυλειτουργικών δενδριτικών πολυμερών που χρησιμοποιούνται συχνά στις εφαρμογές της διακίνησης των φαρμακευτικών ενώσεων, όπου (A) πολυ(ιμίνη προπυλενίου), (B) πολυαμιδοαμίνη, (C) πολυεστέρας, (D) δενδριμερές πολυγλυκερόλης, (E) δενδριμερές με βάση τριαζίνη, (F) δενδριμερές πολύγλυκεροληλεκτρικού οξέος. Εφαρμογή αυτών αποτελεί η χρήση δενδριμερών με εγκαυλλιωμένη δοξορουβικίνη (Dox). (Calderón et al., 2010)

Άλλη στρατηγική για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας σε φαρμακευτικά σκευάσματα με σκοπό την επαναφορά της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία κατά της ασθένειας αποτελεί η χρήση νανοσωματιδιακών συστημάτων διανομής των φαρμάκων (DDS) (Jabr-Milane et al., 2008, Chow et al., 2011) και λιποσωματικών (Stuart et al., 2000, Nobili et al., 2006) και/ή βασισμένων σε πολυμερή προϊόντων νανοϊατρικής (Kabanov et al., 2002, Duncan, 2006, Greco & Vicent, 2009). Μέσα στους διάφορους τύπους νανοσωματιδιακών πολυμερών που έχουν ερευνηθεί για εφαρμογές στα DDS είναι τα δενδριμερή, τα οποία αποτελούν μονομοριακές διακλαδισμένες οντότητες και χρησιμοποιούνται είτε μόνα τους είτε σε κατά σειρά υβριδικά δενδριτικά υλικά (Stiriba et al., 2002, Svenson & Tomalia, 2005, Lee et al., 2005).

Εν προκειμένω, εφαρμογή των δενδριμερών αποτελούμενα από μόρια υπερδιακλαδισμένων να-νοσωματιδίων σε σειρά και αποτελούμενων από πολυεστέρα (HBDL-based NPs), έχοντας εγκapsυλλωμένη δοξοβουβικίνη (Dox) έχει την ικανότητα για αποτελεσματική καταπολέμηση της μικροσωματικής μεταφοράς γλουταθειόνης, η οποία ευθύνεται για ανθεκτικότητα σε αντικαρκινικά φάρμακα σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού (Zeng et al., 2014).

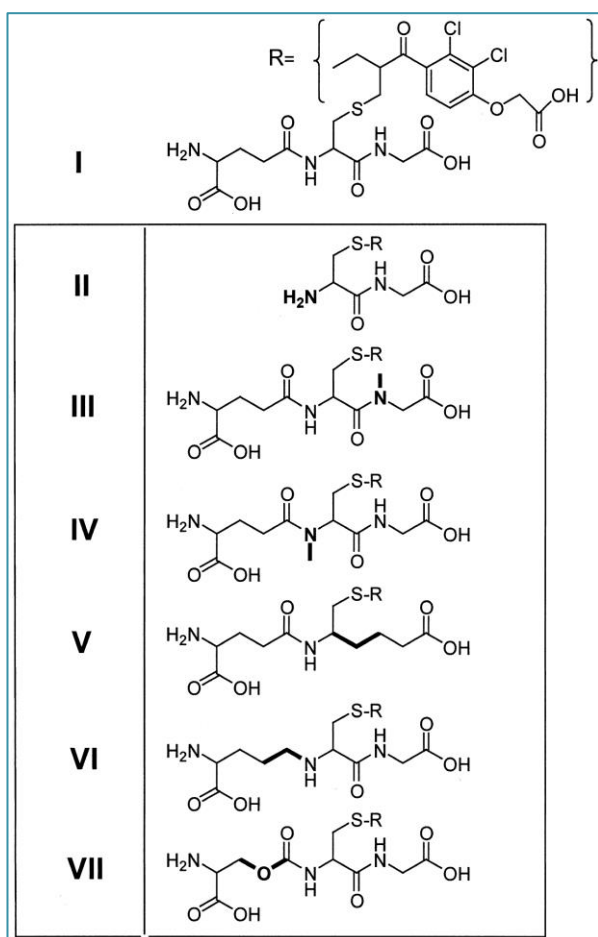
1.6. Πεπτιδομιμητικά ανάλογα γλουταθειόνης

Το πανταχού παρόν τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH) χαρακτηρίζεται ως η επικρατέστερη μη-πρωτεϊνική θειόλη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η γλουταθειόνη έχει πολύτιμο ρόλο στην προστασία του κυττάρου ενάντια σε δυνητικώς επιβλαβείς ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις προερχόμενες από ξеноβιοτικές πηγές ή από ενδογενείς οξειδωτικές διαδικασίες (Anderson, 1998). Οι συζεύξεις της γλουταθειόνης με άλλες ενώσεις, καθώς και τα διαπερατά από τις κυτταρικές μεμβράνες εστερικά παράγωγα αυτών, αποτελούν αποτελεσματικούς συναγωνιστικούς αναστολείς των GSTs (Lyttle et al., 1994, Minhas & Thornalley, 1995).

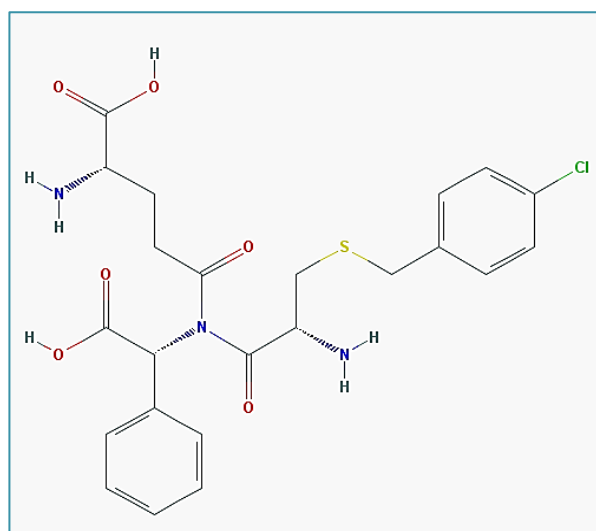
Δυστυχώς, όμως, η ικανότητα αναστολής των συγκεκριμένων συζευγμάτων περιορίζεται δραματικά λόγω της αποδόμησής τους μετά από τη δράση πεπτιδασών. Παρόλο που ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του γ-γλουταμινικού και της κυστεΐνης, καθιστά το πεπτίδιο ανθεκτικό έναντι στην δράση των περισσότερων α-πεπτιδασών, η GSH αποδομείται τάχιστα από το ένζυμο γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (γ-GT). Η διάσπαση των δεσμών από αυτό το ένζυμο, το οποίο έχει ιδιαίτερα υψηλή δραστηριότητα στους νεφρούς, αποτρέπει την *in vivo* χρήση των συζευγμάτων γλουταθειόνης (Bur et al., 2002).

Στην αναζήτηση νέων φαρμακευτικών ενώσεων, έχει γίνει προσπάθεια για το σχεδιασμό νέων αναλόγων της γλουταθειόνης με σκοπό την αναστολή των GSTs. Αρκετές τροποποιήσεις έχουν λάβει χώρα στον πεπτιδικό σκελετό της γλουταθειόνης, κυρίως με την αντικατάσταση των αμινοξικών καταλοίπων με άλλα φυσικά ή συνθετικά ανάλογα (Kunze, 1996, Klotz et al., 1998, Kunze & Heps, 2000). Μια πτυχή της προσπάθειας αυτής ήταν και η ανάπτυξη μη θειολικών αναλόγων καταλήγοντας σε ανάλογα S-αλκυλο-γλουταθειόνης, όπου το κυστεΐνυλο-γλυκινικό τμήμα αντικαταστάθηκε από D-αμινοαδιπικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές έδειξαν σταθερότητα έναντι της γ-GT και προκάλεσαν *in vivo* αναστολή μερικών ισοενζύμων GSTs, οι οποίες ανήκαν στις α και μ τάξεις (Adang et al., 1988, Adang et al., 1990, Ouwerkerk-Mahadevan et al., 1995).

Επίσης, για την ενίσχυση της ικανότητας αναστολής των GSTs, το κατάλοιπο της κυστεΐνης της γλουταθειόνης συζεύχθηκε με αιθακρυνικό οξύ (Εικόνα 7), με το σκεπτικό ότι η εν



Εικόνα 7: Οι δομές του συμπλόκου γλουταθειόνης-αιθακρυνικού οξέος (I), καθώς και τροποποιημένα ανάλογα αυτών. Οι περιοχές απόκλισης των ενώσεων II-VII σε σύγκριση με την αρχική (I) σημαίνονται εντονότερα. Οι ενώσεις IV, VI και VII είναι σταθερές έναντι της υδρόλυσης από τη γ -GT. (Burg et al., 2002)



Εικόνα 8: Η δομή της ένωσης TER-117

λόγω ένωση αποτελεί αναστολέα των περισσότερων ισοενζύμων GST (Ploemen et al., 1990, Awasthi et al., 1993). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επεμβάσεις στη ραχοκοκκαλιά της γλουταθειόνης δεν έχουν εξίσου τα αναμενόμενα αποτελέσματα για όλα τα ισοένζυμα και, συνεπώς, εμφανίζεται ήδη εκλεκτικότητα έναντι των αναλόγων αυτών. Βέβαια, η εκλεκτικότητα μπορεί να επιτευχθεί με αντικατάσταση της ενεργού ομάδας του αιθακρυνικού οξέος με μια καταλληλότερη και υδρόφοβη ένωση και με αυτόν τον τρόπο, επίσης, να έχουμε αποφυγή της εγγενούς αστάθειας του EA (Burg et al., 2002).

Εκμεταλλούμενοι το γεγονός της υψηλής συγγένειας των ενζύμων αυτών ως προς το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης, οι πεπτιδομιμητικές ενώσεις GSH αποτελούν περισσότερο εξειδικευμένους αναστολείς των GSTs (Adang et al., 1990). Μια από αυτές τις ενώσεις είναι η TER-199, γνωστή και ως TLK-199 (γ -γλουταμυλο-S-(βενζυλο)κυστεΐνυλο-R(-)-φαινυλο-γλυκίνο-διαιθυλεστέρα) (Εικόνα 3). Η συγκεκριμένη ένωση εισέρχεται τάχιστα στα κύτταρα και ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικές εστεράσες στην ένωση TER-117, έναν επιλεκτικό αναστολέα του hGSTP1. Στην πραγματικότητα, η ένωση αυτή περιλαμβάνει μια φαινυλογλυκινική ομάδα, η οποία αλληλεπιδρά κατά τρόπο εξειδικευμένο με την υδρόφοβη κοιλότητα (H-θέση) της hGSTP1, κοντά στη θέση πρόσδεσης της GSH (G-θέση). Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπου κυριαρχεί η υπερεκφραζόμενη GSTP1, η ένωση TER-117 (Εικόνα 8) έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα των αζωθυπεριτών, όπως η μελφαλάνη και η χλωραμβουκίλη, καθώς και αλκυλιωτικών παραγόντων γενι-

κότερα (*Morgan et al., 1996*).

Λόγω της ευαισθησίας στην αποδόμηση από τη δράση της γ -GT, η οποία μπορεί να παρεμποδίζει τη δράση τους *in vivo*, διάφορες ερευνητικές ομάδες συνέθεσαν ανάλογα της γλουταθειόνης σταθερά έναντι της δράσης της συγκεκριμένης πεπτιδάσης και μελετήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς των GSTs. Μια στρατηγική σύνθεσης των αναλόγων αυτών περιελάμβανε την εισαγωγή του συνδέσμου ουρεθάνης OCONH, με σκοπό την αντικατάσταση του κατάλοιπου γ -γλουταμυλο CH₂-CO-NH (*Cacciatore et al., 2003*). Τα συγκεκριμένα ανάλογα που συντέθηκαν, χαρακτηρίζονται από το εν λόγω κατάλοιπο ουρεθάνης με την ιδιότητα της ισοεστερικής υποκατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το τροποποιημένο ανάλογο της γλουταθειόνης L- γ -(γ -οξα)γλουταμυλο-(S-9-φθοροενυλομεθυλο)-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη (*Εικόνα 3*) αναστέλλει το ισoenζυμο hGSTA1 με εξειδικευμένο τρόπο, αν και με ελαττωμένη αποτελεσματικότητα συγκρινόμενο με την πρωταρχική ένωση (*Cacciatore et al., 2005*). Η παράγωγη αυτή ένωση ίσως να αποτελεί και μια ενδιαφέρουσα τροπή στην έρευνα για νέες ενώσεις χρήσιμες στην αντιμετώπιση όγκων που υπερεκφράζουν το hGSTA1.

Παράλληλα, έγινε και σύνθεση του αναλόγου γλουταθειόνης UrPhg, καθώς και του διαιθυλεστερικού παραγώγου UrPhg-Et₂, ικανού να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες (*Εικόνα 3*). Η συγκεκριμένη ένωση περιλαμβάνει την φαινυλογλυκινική ομάδα του TER199 και σταθεροποιείται έναντι της γ -GT μέσω της εισαγωγής ενός ισοεστερικού πεπτιδικού δεσμού τύπου ουρεθάνης. Η ένωση UrPhg αναστέλλει με συναγωνιστικό τρόπο τα ισoenζυμα hGSTA1, hGSTM1 και hGSTP1. Επίσης, η εκλεκτικότητα που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος αναστολέας για το hGSTP1 είναι 4-10 φορές μεγαλύτερη από αυτήν των υπολοίπων ισoenζύμων των α και μ τάξεων. Το ανάλογο UrPhg, ωστόσο, είναι ασθενέστερος αναστολέας του hGSTP1 εν συγκρίσει με την μητρική ένωση TER199 (*Burg et al., 2006*).

Σε γενικές γραμμές, τα συγκεκριμένα ανάλογα γλουταθειόνης παρουσιάζουν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά, καθώς εκτός της αναστολής που επιδιώκουμε, έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν τη διαδικασία μεταγωγής σήματος. Στην πραγματικότητα, μέσω της εκλεκτικότητας για τη hGSTP1, διεγείρεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού του MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) και προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα καρκινικών σειρών (*Raza et al., 2009*).

Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης πεπτιδομιμητικών ενώσεων γλουταθειόνης

Είναι αποδεδειγμένο ότι τα συζεύγματα γλουταθειόνης αποτελούν καλούς αναστολείς των GSTs σε *in vitro* προσδιορισμούς (*Chen et al., 1986, Ong et al., 1986, Clark et al., 1988*). Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν ευαισθησία στην μεμβρανική πρωτεΐνη γ -GT

(*Hanigan, 1998*). Εκτός αυτού, είναι γνωστή η λειτουργία των GSTs και η δημιουργία των συμπλόκων με τη γλουταθειόνη και άλλες ενώσεις. Η εισαγωγή τέτοιων αναλόγων έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον των κυττάρων μέσω της δράσης των πρωτεϊνών MRP. Ειδικότερα σε καρκινικούς ιστούς, που εμφανίζουν αντοχή σε πολλαπλά φαρμακευτικά προϊόντα, οι GSTs και οι MRP συνήθως βρίσκονται σε υπερέκφραση και δρουν είτε συνεργιστικά είτε ξεχωριστά με αποτέλεσμα τη μείωση της αποδοτικότητας των πεπτιδομιμητικών σκευασμάτων (*Morrow et al., 1998*).

Από την άλλη πλευρά, η επιλογή της χρήσης των συγκεκριμένων ενώσεων έχει τα πλεονεκτήματα που δίνουν την ευκαιρία για περαιτέρω έρευνα. Το μόριο της γλουταθειόνης αποτελεί ελκυστικό στόχο για χημική τροποποίηση, λόγω της δομικής της απλότητας και του μικρού μοριακού βάρους του. Γι' αυτό τον λόγο έχει σχεδιαστεί και συντεθεί μεγάλος αριθμός δομικών αναλόγων, τα οποία και θέλουμε να προσομοιάζουν στο φυσικό υπόστρωμα των ενζύμων ως προς τη δομή, το μέγεθος και τη λειτουργική ομάδα (*Douglas et al., 1989, Lucente et al., 1998*). Επίσης, τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα ανάλογα γλουταθειόνης, και κυρίως τα τροποποιημένα στον πεπτιδικό δεσμό συζεύγματα γλουταθειόνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επέμβουν σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η ανθεκτικότητα σε αντικαρκινικά φάρμακα μέσω της hGSTP1 ή η μεταγωγή σήματος μέσω MAP κινάσης. Επιπλέον, οι τροποποιημένες ενώσεις γλουταθειόνης είναι αναστολείς των εξαρτώμενων από τη γλουταθειόνη ενζύμων και, επεμβαίνοντας στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των hGSTP1 και JNK (c-Jun N-terminal Kinases), έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τη γονιδιακή μεταγραφή. Η χρήση των ενώσεων αυτών έπειτα από την εφαρμογή τους με την ιδιότητα του αναστολέα μπορεί να είναι χρήσιμη στην παροχή πληροφοριών ως προς το μέγεθος της αναστολής της hGSTP1 και την επιρροή τους στην βιολογία των (καρκινικών) κυττάρων (*Burg et al., 2006*).

Η έρευνα με τη χρήση των αναλόγων αυτών έχει δώσει θετικά αποτελέσματα, αν και η εξειδίκευση στους διάφορους όγκους φαίνεται να αποτελεί πρόβλημα. Η συνέχεια στην ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση των αναλόγων της γλουταθειόνης θα οδηγήσει σε περισσότερο στοχευμένη αντιμετώπιση αυτού του συστήματος στον αγώνα κατά του καρκίνου, επιτρέποντας την συνεχώς αυξανόμενη ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή (*Wu & Batist, 2013*).

1.7. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Παρόλο που τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι περιορισμένα, η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση είκοσι πέντε νέων συνθετικών τριπεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης ως υποστρώματα ή αναστολείς των προϊόντων έκφρασης του πολυμορφικού γονιδί-

ου GSTP1 στον άνθρωπο, ήτοι τριών διαφορετικών αλληλομόρφων (hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C) προς μελέτη.

Τα συγκεκριμένα ανάλογα της γλουταθειόνης συντέθηκαν με την τεχνολογία στερεάς φάσης. Ο σχεδιασμός τους βασίστηκε στην αρχική αλληλουχία του φυσικού υποστρώματος των αλλοενζύμων, τη γλουταθειόνη. Γνωρίζοντας το συγκεκριμένο τριπεπτίδιο και τη συμβολή του στην αποτοξινωτική δράση των GSTs, αποφασίστηκε η σύνθεση τεσσάρων ομάδων ενώσεων έχοντας αντικατεστημένα αμινοξικά κατάλοιπα της αρχικής ένωσης με άλλα φυσικά ή συνθετικά αμινοξέα. Στην πρώτη ομάδα επιχειρείται η αύξηση της δομικής σταθερότητας και της βιολογικής δράσης, στη δεύτερη αναδεικνύεται η σημασία της ελεύθερης -SH που βρίσκεται στο μεσαίο αμινοξύ της κυστεΐνης, στην τρίτη ομάδα αυξάνεται η λιποφιλικότητα της ένωσης και οι δομικοί περιορισμοί. Τέλος, στην τέταρτη ομάδα περιλαμβάνονται ανάλογα της GSH με δύο αλλαγές, και βασίζονται στα αποτελέσματα των αξιολογήσεων των αναλόγων των προηγούμενων τριών ομάδων. Περισσότερες λεπτομέρειες των πεπτιδικών αναλόγων που συντέθηκαν υπάρχουν στις **Παραγράφους §2.1.3 & §4.4** και υποβλήθηκαν στη διαδικασία αξιολόγησής τους από τα τρία αλλοένζυμα και τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων ορισμένων επιλεγμένων τριπεπτιδικών αναλόγων.

Τυχόν διαφορετικός βαθμός αναγνώρισης και συμπεριφοράς των συγκεκριμένων ενώσεων έναντι του κάθε αλλοενζύμου, ενδεχομένως να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην εκλεκτική ανίχνευση συγκεκριμένων GSTs, και στον σχεδιασμό χημικών συμπλόκων με την ιδιότητα του αναστολέα του hGSTP1 (*Cacciatore et al., 2005, Burg et al., 2006*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Βιολογικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών προσδιορισμών χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*. Πιο συγκεκριμένα, για τα πειράματα υποκλωνοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη **DH5a** και **NEB Turbo**, ενώ για την ετερόλογη έκφραση το στέλεχος **BL21(DE3)**.

2.1.2. Ένζυμα

Για την πραγματοποίηση της αξιολόγησης των συνθετικών αναλόγων της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις διαφορετικοί αλληλόμορφοι του ισοενζύμου Πι (P) της κυτταροπλασματικής τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C). Τα συγκεκριμένα ένζυμα υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και ακολούθησε ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός για παραλαβή καθαρού παρασκευάσματος των ενζύμων.

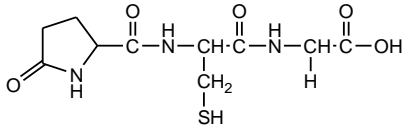
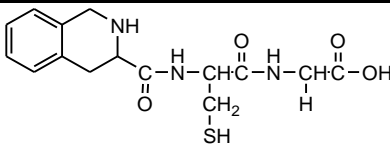
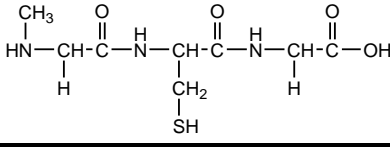
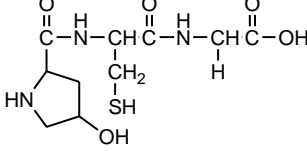
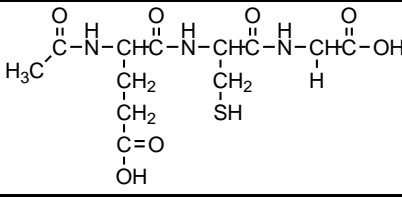
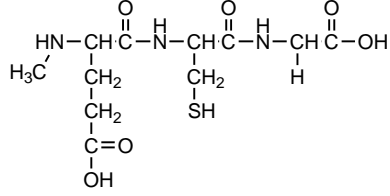
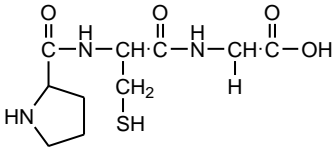
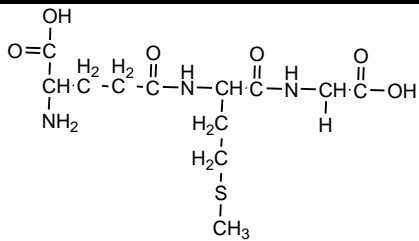
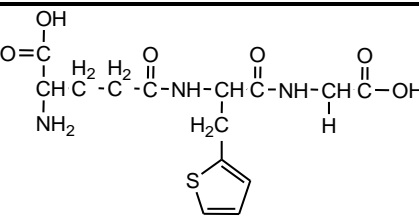
Για την πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε η KAPA High Fidelity πολυμεράση και για την πολυαδενυλίωση του προϊόντος PCR, προ της κλωνοποίησης στον φορέα, χρησιμοποιήθηκε η KAPA Taq πολυμεράση.

2.1.3. Ενώσεις που αξιολογήθηκαν

Τα πεπτιδικά ανάλογα της γλουταθειόνης που αξιολογήθηκαν (**Πίνακας 2.1**) αποτελούν ευγενική προσφορά του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών.

Πίνακας 2.1. Μερικές ιδιότητες των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων της Γλουταθειόνης

	Κωδικός Πεπτιδίου	Αλληλουχία	Δομή	Retention time [*] t _R (min) [*]	Απόδοση (%)	M.B. (g/mol)
	GSH	γ-Glu-Cys-Gly	$ \begin{array}{ccccccc} & & \text{OH} & & & & \\ & & & & & & \\ \text{O}=\text{C} & -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{SH})-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ & & & & & & \\ \text{NH}_2 & & & & & & \end{array} $	2,36	-	307,32

Ομάδα Α	I	pGlu-Cys-Gly		2,86	84	289,31
	II	Tic-Cys-Gly		4,72	72	336,0
	III	Sar-Cys-Gly		1,48	85	249,49
	IV	Hyp-Cys-Gly		1,52	82	290,0
	V	Ac-γ-Glu-Cys-Gly		3,11	92	349,36
	VI	NMeGlu-Cys-Gly		1,55	81	321,35
	VII	Pro-Cys-Gly		1,45	93	275,32
Ομάδα Β	VIII	γ-Glu-Met-Gly		3,55	89	335,38
	IX	γ-Glu-Thi-Gly		4,91	87	357,38

	X	γ -Glu-Cys(tButhio)-Gly		7,35	93	395,49
	XI	γ -Glu-Cys(Acm)-Gly		1,52	86	378,4
	XII	γ -Glu-NMeCys-Gly		1,47	89	321,35
Ομάδα Γ	XIII	γ -Glu-Cys-Nva		4,75	91	349,4
	XIV	γ -Glu-Cys-Nle		6,07	88	363,43
	XV	γ -Glu-Cys-Sar		3,03	91	321,35
	XVI	γ -Glu-Cys-Aib		3,80	82	335,38
	XVII	γ -Glu-Cys-a-t-butyl-Gly		5,27	91	363,15

Ομάδα Δ	XVIII	pGlu-Cys(Trt)-Gly		9,75	68	531,62
	XIX	Sar-Cys(Trt)-Gly		7,94	71	491,60
	XX	Tic-Cys-Ala		5,20	88	351,42
	XXI	Hyp-Cys-Ala		2,11	87	305,35
	XXII	Gly-Cys-Hyp		2,12	79	291,32
	XXIII	Tic-Cys-Aib		5,77	86	365,45
	XXIV	Tic-Cys(Acm)-Gly		4,51	92	408,47
	XXV	Tic-Cys-Sar		4,94	93	351,42

Όλα τα παραπάνω πεπτιδικά ανάλογα είναι υδατοδιαλυτά, πλην των IX, X, XII, XVIII, XIX και XX, τα οποία διαλύονται σε DMSO.

2.1.4. Αναλώσιμα

2.1.4α. Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων

Οι ακόλουθοι πίνακες (*Πίνακες 2.2, 2.3*) παρουσιάζουν τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών προσδιορισμών.

Πίνακας 2.2. Κατάλογος των χρησιμοποιηθέντων αντιδραστηρίων

#	Αντιδραστήριο	Εταιρεία
1	Άγαρ βακτηριολογικής χρήσης (Agar Bacteriological)	Scharlau
2	Αγαρόζη για gel DNA	Nippon Genetics
3	Αιθανόλη απόλυτα καθαρή (Ethanol absolute)	Scharlau
4	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)	Sigma
5	Αλβουμίνη ορού μόσχου (BSA)	Serva
6	Αμπικιλλίνη (Ampicillin ή Amp)	Sigma
7	β-μερκαπτοαιθανόλη	Sigma
8	Βακτηριακή τρυπτόνη (Bacto-Tryptone)	Scharlau
9	Βρωμιούχο αιθίδιο (Et-Br)	
10	Γλυκερόλη 99,5 %	Panreac
11	Γλυκίνη	Sigma
12	D(+)-Γλυκόζη	Sigma
13	Διμεθυλοσουλφοξείδιο 99,9% (DMSO)	Riedel – de Haën
14	Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH ₂ PO ₄)	Sigma
15	Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS)	Sigma
16	Εκκινητές PCR	Invitrogen
17	Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast extract)	Scharlau
18	Θεικό Μαγνήσιο (MgSO ₄)	Sigma
19	Θεικό Νάτριο (NaSO ₄)	Mallinckrodt
20	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG)	AppliChem
21	D(+)-Λακτόζη	AppliChem
22	Κυανό της βρωμοφαινόλης (χρωστική)	Merc
23	Μεθανόλη (MeOH)	Scharlau
24	N, N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδη	Sigma
25	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)	Sigma
26	Νουκλεοτίδια (dNTPs)	Invitrogen
27	Οξικό Νάτριο (CH ₃ COONa)	Merck
28	Οξικό Οξύ (CH ₃ COOH)	Panreac
29	Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο (Tris)	Sigma

30	Υδροχλωρικό Οξύ (HCl)	Scharlau
31	Υπερθειικό Αμμώνιο (APS)	Fluca
32	Υπεροξείδιο του Καλίου (KOH)	Sigma-Aldrich
33	Υπεροξείδιο του Νατρίου (NaOH)	Merck
34	Χλωριούχο αμμώνιο (NH ₄ Cl)	Merck
35	Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl ₂)	Merck
36	Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	Riedel – de Haën
37	Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂)	Riedel – de Haën
38	Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	Sigma-Aldrich
39	Coomassie Brilliant Blue R-250/G-250	Merck
40	DNA Ladder 1 kb	Invitrogen
41	KAPA High Fidelity (HiFi) Polymerase	KAPA Biosystems
42	KAPA Taq Polymerase	KAPA Biosystems
43	Protein Prestained Marker	Invitrogen
44	Sepharose CL6B	Pharmacia

Πίνακας 2.3: Κατάλογος των χρησιμοποιηθέντων υποστρωμάτων

#	Υπόστρωμα	Εταιρεία
1	1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)	Aldrich
2	Γλουταθειόνη (GSH, ανηγμένη)	Sigma

2.1.4β. Εμπορικά πακέτα τυποποιημένων πρωτοκόλλων

Για την πραγματοποίηση εξαγωγής DNA από ηλεκτροφόρημα πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit QIAquick™ Gel Extraction της εταιρείας Qiagen και για την πραγματοποίηση της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit NucleoSpin®Plasmid της εταιρείας Machery – Nagel.

2.1.5. Πλαστικά Αναλώσιμα

Ο Πίνακας 2.4 περιλαμβάνει τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 2.4. Κατάλογος των πλαστικών αναλωσίμων που χρειάστηκαν

#	Είδος	Εταιρεία
1	Πλαστικά ακρορρύγχια (tips)	Greiner Bio-one
2	Πλαστικοί σωλήνες 15 και 50 mL (falcon)	NerbePlus
3	Πλαστικά σωληνάρια 1,5 και 2 mL (eppendorf)	Greiner Bio-one
4	Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης 1 mL (semi-macro)	Greiner Bio-one
5	Τρυβλία <i>Petri</i>	Greiner Bio-one
6	Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης	Spectrum

2.1.6. Εξοπλισμός

2.1.6α. Εργαστηριακός Εξοπλισμός (Όργανα)

- ❖ Η ζύγιση αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων έγινε με χρήση του αναλυτικού ζυγού METTLERAT 261 και του φαρμακευτικού ζυγού METTLER PM2500.
- ❖ Η διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα Verity 96 Well Thermal Cycler της εταιρείας Applied Biosystems.
- ❖ Το pH των διαλυμάτων μετρήθηκε με πεχάμετρο ORION (μοντέλο 410A).
- ❖ Η διάρρηξη των κυττάρων έγινε με τη συσκευή υπερήχων Vibra Cell (Sonics & Materials).
- ❖ Οι κυτταρικές καλλιέργειες έγιναν σε θερμοστατούμενο επωαστήρα με περιστροφική ανακίνηση της εταιρείας LabTech.
- ❖ Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε σε φασματοφωτόμετρο Lamda-Bio ορατού-υπεριώδους (μονής δέσμης) της εταιρίας Perkin-Elmer.
- ❖ Ως υδατόλουτρο χρησιμοποιήθηκε συσκευή της εταιρείας Stuart.
- ❖ Οι φυγοκεντρήσεις των μικροβιακών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκαν με φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH Centrifuge 17 RS, Heraeus SEPATECH Varifuge 20RS και Eppendorf Centrifuge 5804R.
- ❖ Η αποστείρωση έγινε με αυτόκαυστο της εταιρείας «Αφοί Αγγελόπουλοι».
- ❖ Για τις μικροποσότητες δειγμάτων και αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν μηχανικές πιπέτες (Gilson) με μέγιστο ποσό λήψης τα 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L και 1000 μ L.
- ❖ Οι ηλεκτροφορήσεις DNA σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή Mini-Sub®Cell GT της εταιρείας BIO-RAD και οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη συσκευή Mini-Protean®Tetra System της εταιρείας BIO-RAD.
- ❖ Οι φωτογραφίες των πηκτών ηλεκτροφόρησης ελήφθησαν με το μηχάνημα Mini BIS Pro της εταιρείας Bio-Imaging Systems.

2.1.6β. Εργαστηριακός Εξοπλισμός (Λογισμικό)

- ❖ *UVKinLab (Perkin-Elmer Software)*, για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας
- ❖ *GraFit 3.0 (Erithacus Software, Ltd, UK)*, για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis (K_m) και της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max})
- ❖ *PyMOL*, για την επεξεργασία αρχείων pdb

2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.2.1. Θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli*

2.2.1α. Στερεό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB)

- ❖ 0,50 % w/v Εκχύλισμα Ζύμης
- ❖ 1,00 % w/v Τρυπτόνη (ή Πεπτόνη)
- ❖ 1,00 % w/v NaCl
- ❖ 1,50 % w/v Άγαρ βακτηριολογικό

2.2.1β. Υγρό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB)

- ❖ 0,50 % w/v Εκχύλισμα Ζύμης
- ❖ 1,00 % w/v Τρυπτόνη (ή Πεπτόνη)
- ❖ 1,00 % w/v NaCl

2.2.1γ. Υγρό θρεπτικό μέσο S.O.C. (Super Optimal Broth with Catabolite repression)

- ❖ 2,00 % w/v Τρυπτόνη (ή Πεπτόνη)
- ❖ 0,50 % w/v Εκχύλισμα Ζύμης
- ❖ 10,0 mM NaCl
- ❖ 2,50 mM KCl
- ❖ 10,0 mM MgCl₂
- ❖ 10,0 mM MgSO₄
- ❖ 20,0 mM Γλυκόζη

2.2.1δ. Υγρό θρεπτικό μέσο περιέχον λακτόζη για της προαγωγή της ετερόλογης έκφρασης

- ❖ 0,50 % w/v Γλυκερόλη
- ❖ 0,50 % w/v Εκχύλισμα Ζύμης
- ❖ 1,00 % w/v Τρυπτόνη (ή Πεπτόνη)
- ❖ 0,05 % w/v Γλυκόζη
- ❖ 0,20 % w/v Λακτόζη
- ❖ 0,07 % w/v Θεικό Νάτριο (NaSO_4)
- ❖ 0,25 % w/v Χλωριούχο Αμμώνιο (NH_4Cl)
- ❖ 0,01 % w/v Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl_2), Κάλιο (KCl), Μαγνήσιο (MgCl_2)

2.2.2. Διαλύματα Αντιβιοτικών

A. Διάλυμα Αμπικιλίνης (Amp) 100 mg/mL

Ποσότητα 100 mg από το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ζυγίζεται και διαλύεται σε αποστειρωμένο νερό με τη χρήση έντονης ανάδευσης (vortex). Για την κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιείται η απαραίτητη ποσότητα από το αντιβιοτικό για να έχουμε επιθυμητή συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$. Το διάλυμα του εν λόγω αντιβιοτικού φυλάσσεται και στους -20°C .

2.2.3. Διαλύματα προσδιορισμού των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

A. Πυκνό διάλυμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250

- ❖ 100 mg χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250*
- ❖ 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% v/v)
- ❖ 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v)

Όλα τα παραπάνω συστατικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που δημιουργείται, αφού απαερωθεί, διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

B. Έτοιμο διάλυμα αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA)

Ζυγίζονται 2 mg BSA σε πλαστικό σωληνάριο erpendorf και διαλύονται σε 10 mL ddH₂O. Η ποσότητα μοιράζεται σε ξεχωριστά δοχεία και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

2.2.4. Διαλύματα και αντιδραστήρια προετοιμασίας των δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3), DH5a και NEB Turbo.

A. Διαλύματα Χρωριούχου Ασβεστίου

- ❖ 25 mM CaCl_2
- ❖ pH = 8
- ❖ 10 mM Tris – HCl

- ❖ 75 mM CaCl₂
- ❖ 10 mM Tris – HCl
- ❖ pH = 8

B. Γλυκερόλη 99,5 %

2.2.5. Διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης

A. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων TAE 50X (Tris-Acetate-EDTA buffer).

Για διάλυμα συνολικού όγκου 1 L ζυγίζονται 242 g Tris base και αναμειγνύονται με 57,1 mL παγόμορφου οξικού οξέος και 100 mL διαλύματος EDTA συγκέντρωσης 0,5 M και pH = 8. Το προκύπτον διάλυμα αραιώνεται με δις απιονισμένο νερό (ddH₂O) μέχρι να συμπληρωθεί το ένα λίτρο που απαιτείται για το διάλυμα. Στη συνέχεια, αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

B. Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 10 mg/mL

Σε 100 mL αποστειρωμένου νερού (ddH₂O) διαλύεται 1 g χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου. Η ανάδευση με τον μαγνητικό αναδευτήρα διαρκεί για αρκετές ώρες για καλή διάλυση της χρωστικής. Το διάλυμα μεταφέρεται σε σκοτεινό δοχείο και αποθηκεύεται στους 4°C.

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Buffer electrophoresis)

Ποσότητα 6 mL διαλύματος TAE 50X αραιώνονται με ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο των 300 mL.

Δ. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων

Αναμειγνύονται 10 mL διαλύματος γλυκερόλης 50 % v/v και 200 μL διαλύματος EDTA συγκέντρωσης 0,5 M και pH = 8.

2.2.6. Διαλύματα για ετερόλογη έκφραση των αλλοενζύμων της hGSTP1

A. Διάλυμα IPTG για την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου σε πειράματα μικρής κλίμακας

Η επαγωγή της έκφρασης του ανασυνδυασμένου πρωτεϊνικού μορίου πραγματοποιείται με εισαγωγή του IPTG (ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο) σε συγκέντρωση 1 mM στο σύνολο του θρεπτικού μέσου, όπου τοποθετείται η καλλιέργεια. Γι' αυτό το σκοπό, ζυγίζεται

η απαραίτητη ποσότητα IPTG σε ένα δοχείο erpendorf κάθε φορά και διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O.

2.2.7. Διαλύματα για τον καθαρισμό των ενζύμων σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας.

A. Ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) [*διάλυμα εξισορρόπησης και έκπλυσης της στήλης*].

- ❖ 20 mM KH₂PO₄ και ρύθμιση του pH στο 7 με χρήση διαλύματος KOH.

B. Ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) με ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH reduced) [*διάλυμα εκλούσεων*].

- ❖ 20 mM KH₂PO₄
- ❖ 10 mM GSH
- ❖ Ρύθμιση του pH στην τιμή 7

Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται κάθε φορά που πραγματοποιείται καθαρισμός του ενζύμου στη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας.

Γ. Διάλυμα αναγέννησης 1

- ❖ 0,1 M Tris – HCl
- ❖ 1,0 M NaCl
- ❖ Ρύθμιση του pH = 8,5

Δ. Διάλυμα αναγέννησης 2

- ❖ 0,1 M CH₃COONa
- ❖ 1,0 M NaOH
- ❖ Ρύθμιση του pH = 5,5

2.2.8. Διαλύματα φωτομετρικού προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της GST.

A. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄)

- ❖ 100 mM KH₂PO₄ και ρύθμιση του pH στο 6,5 με την προσθήκη διαλύματος KOH.

B. Υδατικό διάλυμα του φυσικού υποστρώματος της GST, τριπεπτιδίου γλουταθειόνης

- ❖ 75 mM GSH

Γ. Διάλυμα του υποστρώματος 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB).

- ❖ 30 mM CDNB και η ποσότητα που ζυγίζεται διαλύεται σε αιθανόλη με τη χρήση υπερήχων. Το διάλυμα που προκύπτει προστατεύεται από το φως.

2.2.9. Διαλύματα και αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

A. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (Separating buffer)

- ❖ 2.935 μL ddH₂O
- ❖ 2.935 μL διαλύματος ακρυλαμίδης 30 % w/v
- ❖ 875 μL ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (separating buffer)
- ❖ 170 μL APS
- ❖ 70 μL διαλύματος SDS περιεκτικότητας 10 % w/v
- ❖ 6,24 μL TEMED

Το διάλυμα αναμειγνύεται με πιπέτα και μεταχειρίζεται με γοργούς ρυθμούς λόγω της διαδικασίας του πολυμερισμού που λαμβάνει χώρα μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου TEMED.

B. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Separating buffer)

Ζυγίζεται ποσότητα 36,3 g Tris base και διαλύεται σε 100 mL ddH₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 8,8 με τη χρήση πυκνού διαλύματος HCl.

Γ. Διάλυμα ακρυλαμίδης 30 % w/v

Ζυγίζεται ποσότητα 30 g ακρυλαμίδης και 0,8 g N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης. Τα δύο αυτά συστατικά διαλύονται σε νερό μέχρι τον όγκο των 100 mL.

Δ. Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 1,5 % w/v

Ποσότητα 15 mg APS ζυγίζεται και διαλύεται σε 1 mL ddH₂O. Παρασκευάζεται κάθε φορά που πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Ε. Διάλυμα δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS) 10 % w/v

Ποσότητα 10 g SDS διαλύεται σε 90 mL ddH₂O με θέρμανση στους 68°C. Διορθώνουμε το pH μέχρι το 7,2 με προσθήκη HCl και συμπληρώνουμε έως τα 100 mL με νερό.

ΣΤ. Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)

Ζ. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (Stacking buffer)

- ❖ 3.450 μL ddH₂O
- ❖ 625 μL διαλύματος ακρυλαμίδης 30 % w/v
- ❖ 625 μL ρυθμιστικού διαλύματος επιστοιβάξης (Stacking buffer)
- ❖ 170 μL διαλύματος APS
- ❖ 70 μL διαλύματος SDS περιεκτικότητας 10% w/v
- ❖ 6,24 μL TEMED

Το διάλυμα πηκτής, όπως και το προηγούμενο της πηκτής διαχωρισμού, αναμειγνύεται και εφαρμόζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα λόγω του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης και της πήξης του διαλύματος.

H. Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (Stacking buffer)

Ποσότητα 6,06 g Tris base ζυγίζεται και διαλύεται μέχρι τον όγκο των 100 mL με δις απιονισμένο νερό (ddH₂O). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 6,8 με την προσθήκη πυκνού διαλύματος HCl.

Θ. Ρυθμιστικό διάλυμα διεξαγωγής της ηλεκτροφόρησης (Running buffer)

Για ποσότητα 1000 mL απαιτείται ζύγιση 30,3 g Tris base, 144 g γλυκίνης και 10 g SDS. Αυτά τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται σε ddH₂O μέχρι τον απαιτούμενο όγκο. Στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών απαιτούνται 70 mL από το παραπάνω διάλυμα αραιωμένα σε 630 mL ddH₂O.

I. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων περιέχον τη χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης [Loading buffer (1X SDS gel-loading buffer)]

- ❖ 50 mM Tris-HCl (pH = 6,8)
- ❖ 100 mM διθειοθρεϊτόλη
- ❖ 2% w/v SDS
- ❖ 0,1 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης
- ❖ 10% v/v γλυκερόλη

IA. Αντιδραστήριο β-μερκαπτοαιθανόλης

Χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος που περιέχει τη χρωστική που βάφει τα δείγματα που φορτώνονται στα πηγαδάκια και για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών.

IB. Υδατικό διάλυμα χρώσης του ηλεκτροφορήματος μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης

- ❖ 45 % v/v μεθανόλη
- ❖ 7 % v/v οξικό οξύ
- ❖ 0,25 – 1,00 % w/v χρωστική *Coomassie Brilliant Blue R-250*

ΙΓ. Διάλυμα αποχρωματισμού I (Destaining I)

- ❖ 40 % v/v μεθανόλη
- ❖ 7 % v/v οξικό οξύ

ΙΔ. Διάλυμα αποχρωματισμού II (Destaining II)

- ❖ 5 % v/v μεθανόλη
- ❖ 7 % v/v οξικό οξύ

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (στο εξής PCR) πραγματοποιείται με σκοπό την ενίσχυση και απομόνωση των τριών γονιδίων των αλληλομόρφων του ισοενζύμου P της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου. Τα συγκεκριμένα αλλοένζυμα παρασχέθηκαν ήδη υποκλωνοποιημένα σε φορείς (η hGSTP1*A βρισκόταν ήδη στον φορέα *pEXP5-CT/TOPO*[®], ενώ οι hGSTP1*B και hGSTP1*C είχαν εισαχθεί στον φορέα *pOXO4*), αλλά κρίθηκε αναγκαία η επανεισαγωγή όλων στον πλασμιδιακό φορέα *pEXP5-CT/TOPO*[®].

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μ L σε ειδικό δοχείο *erpendorf* κατάλληλο για τη διεξαγωγή PCR. Στο μείγμα αντίδρασης περιλαμβάνονται 10 ng από το μητρικό πλασμίδιο από το οποίο και θα απομονωθεί το επιθυμητό γονίδιο, 0,125 mM από το κάθε νουκλεοτίδιο, ήτοι 0,5 mM dNTPs, ποσότητα 10 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα 5X της KAPA HiFi πολυμεράσης, 8 pmol από τον κάθε εκκινητή (ευθύ και ανάστροφο) και 1 U από την KAPA HiFi πολυμεράση. Τέλος, ο τελικός όγκος των 50 μ L συμπληρώνεται με την προσθήκη αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH₂O).

Όλα τα αντιδραστήρια πλην της πολυμεράσης, προστίθενται και ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση του σωληνίσκου *erpendorf*. Στη συνέχεια, η θερμοανθεκτική πολυμεράση εισάγεται τελευταία λίγα δευτερόλεπτα πριν την έναρξη της διαδικασίας PCR. Οι εκκινητές που χρησι-

μοποιούνται είναι οι ίδιοι και στις τρεις περιπτώσεις, καθώς οι όποιες διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών παρουσιάζονται σε θέσεις πέραν των εκκινήτων.

Η αλληλουχία των εκκινήτων, καθώς και των συνθηκών βάσει των οποίων λαμβάνει χώρα η PCR παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.5**.

Πίνακας 2.5. Οι εκκινήτες και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCR

Εκκινήτες	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία με κατεύθυνση 5'-3'	
hGSTP1F (ευθύς)	5'-ATG-CCG-CCC-TAC-ACC-GTG-GT-3'	
hGSTP1R (ανάστροφος)	5'-TCA-CTG-TTT-CCC-GTT-GCC-AT-3'	
Στάδια της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια (min)
1. Αρχική Αποδιάταξη	95	3
2.1 Αποδιάταξη	95	1
2.2 Υβριδισμός	53	1
2.3 Επιμήκυνση	72	1
3. Τελική Επιμήκυνση	72	10

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης

Η ανάλυση που μπορεί να γίνει μέσω της ηλεκτροφόρησης αυτής μπορεί να είναι ποιοτική, αλλά και ποσοτική. Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, είναι απαραίτητο ένα πόρωδες πήκτωμα αγαρόζης μέσα στο οποίο θα κινηθούν τα τμήματα DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αναλόγως του μεγέθους των τμημάτων DNA που διαχωρίζονται, η συγκέντρωση του πηκτώματος της αγαρόζης μπορεί να κυμαίνεται από 0,7 % έως και 2 % w/v και έτσι καθορίζεται και το διαφορετικό μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται. Το ουδέτερο φορτίο που και ο μικρότερος βαθμός πολυπλοκότητας εν συγκρίσει με το άγαρ, αποτρέπουν την αλληλεπίδραση της αγαρόζης με τα βιομόρια και παράλληλα την καθιστούν ιδανική για χειρισμούς με πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

Η εν λόγω διαδικασία, αρχικά, περιλαμβάνει την παρασκευή ποσότητας 50 mL πηκτής ηλεκτροφόρησης 1 % w/v περιεκτικότητας σε αγαρόζη με την ανάμειξη 1 mL διαλύματος 50X TAE, μαζί με 0,5 g αγαρόζης σε 49 mL ddH₂O. Το διάλυμα προστίθεται σε κωνική φιάλη και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για χρονικό διάστημα 3 min, ώστε να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο για να ελαττωθεί η θερμοκρασία και εκεί προστίθεται ποσότητα 4 μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), για τελική συγκέντρωση 0,5 μg/mL, και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση. Έπειτα, το διάλυμα διοχετεύεται στην συ-

σκευή πήξης της πηκτής, η οποία είναι προετοιμασμένη κατάλληλα και έχει τοποθετημένη την κατάλληλη χτένα για τις ειδικές εσοχές (τα πηγαδάκια), όπου εγχέονται τα δείγματα. Η χρήση του EtBr έγκειται στο γεγονός ότι παρεμβάλλεται ανάμεσα στη διπλή έλικα και φθορίζει υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV. Τέλος, η πηκτή αφήνεται σε ηρεμία για διάστημα 20 – 30 min, ώσπου να στερεοποιηθεί.

Κατά τη διάρκεια αναμονής παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, το οποίο είναι διάλυμα συνολικού όγκου 300 mL αποτελούμενο από 6 mL 50X TAE και 294 mL ddH₂O. Επίσης, προετοιμάζονται τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση με την προσθήκη 10 μL από το προϊόν της PCR και 5 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Επίσης, χρησιμοποιείται και ένας μάρτυρας (1 kb Ladder), που αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους. Από τον μάρτυρα αναμειγνύονται 1 μL και 5 μL από το προηγούμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα και ο μάρτυρας αναδεύονται έντονα με τη χρήση μηχανήματος έντονης ανάδευσης (vortex) και στη συνέχεια στη φυγόκεντρο υποβάλλονται σε ένα απλό στροβίλισμα (σπιν) για την απαλλαγή από ενδεχόμενο αφρισμό που μπορεί να είχε προκληθεί.

Εφόσον η πηκτή έχει πήξει, μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου και πληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια φορτώνονται ο μάρτυρας και τα δείγματα. Σε ένα από τα πηγαδάκια προστίθεται χρωστική, συνήθως κυανό της βρωμοφαινόλης, για την καλύτερη παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου από 87 έως 99 V περίπου, τα μόρια ανάλογα του μοριακού τους βάρους κινούνται προς τον θετικό πόλο του ηλεκτροδίου. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρεται σε ειδική συσκευή παρατήρησης και με την εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) γίνεται η παρατήρηση των ζωνών που εμφανίζονται.

2.3.3. Απομόνωση και Καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης

Το πήκτωμα της αγαρόζης, στο οποίο έχει γίνει ανάλυση DNA, μεταφέρεται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδες φως. Εκεί, το επιθυμητό κομμάτι της πηκτής, από το οποίο θα αφαιρεθεί το DNA αφαιρείται με τη βοήθεια ξυραφιού και ζυγίζεται εφόσον τοποθετηθεί σε αποστειρωμένο δοχείο erpendorf. Στη συνέχεια, για την παραλαβή του συγκεκριμένου τμήματος DNA ακολουθείται η μέθοδος που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen). Η εν λόγω διαδικασία βασίζεται στην προσρόφηση του DNA σε πηκτή πυριτίου (silica gel) παρουσία χαστροπικών παραγόντων.

Η τελική έκλουση, που περιέχει και το τμήμα DNA που απομονώθηκε υποβάλλεται εκ νέου σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης με σκοπό την επιβεβαίωση της καλής ποιότητας της απομόνωσης που πραγματοποιήθηκε.

2.3.4. Υποκλωνοποίηση των γονιδίων των αλλοενζύμων της hGSTP1 στο πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* DH5a ή NEB Turbo.

Η διαδικασία της εισαγωγής των γονιδίων στο πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο οδηγιών pEXP5-CT/TOPO®TA Kit της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.).

2.3.4.1. Προσθήκη καταλοίπων Αδενίνης (πολυαδενυλίωση) του 3' άκρου του προϊόντος PCR.

Για να διευκολύνουμε την πρόσδεση του γονιδίου στον φορέα και να αυξήσουμε τις πιθανότητες επιτυχίας της υποκλωνοποίησης εισάγουμε αλληλουχία καταλοίπων Αδενίνης στο 3' άκρο του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Το συγκεκριμένο στάδιο παρεμβάλλεται, καθώς η KAPA HiFi πολυμεράση, που χρησιμοποιήθηκε για την PCR, δεν δημιουργεί ουρά Αδενινών.

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μ L σε αποστειρωμένο δοχείο erpendorf ειδικό για PCR και περιλαμβάνει:

- ❖ 10-15 μ L προϊόντος PCR ή καθαρισμένου DNA από πηκτή αγαρόζης
- ❖ 0,1 μ L dATPs (από αρχικό διάλυμα 100 mM)
- ❖ 5 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 10X για την Taq πολυμεράση
- ❖ 29,7-34,7 αποστειρωμένο ddH₂O
- ❖ 0,2 μ L (1 U) KAPA Taq πολυμεράσης

Στη συνέχεια, τοποθετούμε το erpendorf στους 72°C για 15 min, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

2.3.4.2. Υποκλωνοποίηση των γονιδίων στο φορέα pEXP5-CT/TOPO® και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a ή NEB Turbo.

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας περιλαμβάνει την αντίδραση υποκλωνοποίησης του γονιδίου στον φορέα pEXP5-CT/TOPO®. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την ανάμειξη:

- ❖ 1 – 4 μL του προϊόντος της αντίδρασης πολυαδενυλίωσης
- ❖ 1 μL διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl_2)
- ❖ 1 μL φορέα pEXP5-CT/TOPO®
- ❖ δις-απιονισμένο αποστειρωμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τον τελικό όγκο των 6 μL

Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μείγματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) για χρονικό διάστημα 5-30 min με σκοπό την ένωση του γονιδίου με τον πλασμιδιακό φορέα. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος αυτού, το μείγμα τοποθετείται στους 4°C σε παγόλυτρο.

Αμέσως μετά, ακολουθεί ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων (DH5a ή NEB Turbo). Ποσότητα 50 μL από τα συγκεκριμένα κύτταρα, εφόσον έχουν αποψυχθεί από τις συνθήκες -80°C υπό τις οποίες έχουν αποθηκευτεί, αναμειγνύεται με τα 6 μL της αντίδρασης υποκλωνοποίησης. Το μείγμα αυτό, επωάζεται στον πάγο για 30 min, ενώ ενδιάμεσα παρεμβάλλονται πολύ ήπιες αναδεύσεις. Στη συνέχεια, ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για 30 s και αμέσως μετά μεταφέρονται και πάλι στον πάγο για χρονικό διάστημα 2-5 min. Κατόπιν, προστίθενται 250 μL από το θρεπτικό μέσο S.O.C. άνευ αντιβιοτικού, γίνεται καλή ανάμειξη κυττάρων και θρεπτικού μέσου και τοποθετούνται στον επωαστήρα στις 200 rpm και στους 37°C για χρονικό διάστημα 1 h.

Τέλος, ακολουθεί επίστρωση ποσότητας 100 – 120 μL σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB και δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Το τρυβλίο τοποθετείται στους 37°C για 12-16 h.

2.3.5. Προαγωγή ετερόλογης έκφρασης των μετασχηματισμένων κυττάρων με το υποκλωνοποιημένο γονίδιο.

Έχοντας επιβεβαιώσει την ύπαρξη μετασχηματισμένων κυττάρων στο τρυβλίο με μέσο επιλογής το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, επιλέγουμε τυχαία και εμβολιάζουμε μονήρη αποικία σε διαφορετικά δοχεία falcon, τα οποία περιέχουν θρεπτικό μέσο LB και αντιβιοτικό amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Σκοπός είναι να γίνει σάρωση των αποικιών και να ανιχνευτεί η πιθανή παρουσία της ενζυμικής δραστηριότητας από το ανασυνδυασμένο ένζυμο της hGSTP1*(A, B ή C). Οι συγκεκριμένες προκαλλιέργειες από την κάθε αποικία επωάζονται σε θάλαμο περιστροφικής ανάδευσης στις 200-220 rpm, σε θερμοκρασία 37°C για 16 h.

Την επόμενη ημέρα, μεταγγίζεται μικρή ποσότητα από την κάθε προκαλλιέργεια σε δοχεία erpendorf και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 2 min, όπου αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και η ποσότητα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -20°C . Η εναπομείνασα ποσότητα της προκαλλιέργειας μεταφέρεται σε φιάλη που περιέχει 50 mL θρεπτικού μέσου παρουσία του αντιβιοτικού και επώαζεται στους 37°C με ανάδευση για 30 min. Έπειτα, προστίθεται ποσότητα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και οι καλλιέργειες αφήνονται για επώαση επιπλέον 3 h με σκοπό την επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης των ενζύμων.

Με τη λήξη του χρονικού διαστήματος των 3 h, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των καλλιεργείων στις 8.000 rpm για 10 min και στην συνέχεια αποθήκευση της μάζας των κυττάρων στους -20°C .

2.3.6. Θραύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος

Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων και επαναιωρείται σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι το ίδιο που χρησιμοποιείται στην εξισορρόπηση της στήλης για τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, συνεπώς, είναι ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 20 mM και pH = 7.

Η διαδικασία θραύσης των κυττάρων περιλαμβάνει την επίδραση υπερήχων για τέσσερις ή πέντε φορές διάρκειας 10 s τηρώντας ένα μεσοδιάστημα περίπου 30 s. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στον πάγο για αποφυγή της αύξησης της θερμοκρασίας του ενζυμικού εκχυλίσματος. Το τελικό εναιώρημα που προκύπτει φυγοκεντρείται για 5 min στις 13.000 rpm και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτοντας το ίζημα που κατακάθεται στη βάση του erpendorf. Κατόπιν, πραγματοποιείται φασματοσκοπική δοκιμή της ενζυμικής δραστηριότητας.

2.3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρησιμοποίηση εμπορικού πακέτου (kit)

Κατά τη διαδικασία της σάρωσης των αποικιών που υποβλήθηκαν σε έκφραση μικρής κλίμακας, αν βρεθούν κάποιες με ενζυμική δραστηριότητα GST επιλέγονται για απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA. Η ποσότητα κυττάρων που έχει αποθηκευτεί από την αρχική προκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ως πηγή για την παραλαβή του επιθυμητού γενετικού υλικού. Γι' αυτό το λόγο, ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εμπορικό kit NucleoSpin® Plasmid της εταιρείας Machery – Nagel. Στη συνέχεια, ακολουθείται η διαδικασία ανάλυσης του

παραληφθέντος DNA σε πηκτική αγαρόζη για την αξιολόγηση της καθαρότητας του γενετικού υλικού.

2.3.8. Μετασχηματισμός δεκτικών εκφραστικών κυττάρων *Escherichia coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA

Μετά την επιβεβαίωση της εισαγωγής του επιθυμητού γονιδίου στον φορέα pEXP5-CT/TOPO® με τη διαδικασία της αλληλούχησης από την εταιρεία CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών εκφραστικών κυττάρων BL21(DE3) για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των ετερόλογα εκφρασμένων ενζύμων. Η διαδικασία των βημάτων είναι η ίδια όπως περιγράφεται και την **παράγραφο §2.3.4.2** με τη διαφοροποίηση της μη χρήσης του πλούσιου θρεπτικού μέσου S.O.C., αλλά του LB. Επίσης, υπάρχουν δύο εναλλακτικές της δημιουργίας υγρής προκαλλιέργειας μετασχηματισμένων κυττάρων σε φιάλη με LB και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής ή της επίστρωσης τρυβλίου με LB και αντιβιοτικό για ανάπτυξη μετασχηματισμένων αποικιών. Στη συνέχεια, ακολουθεί προαγωγή της ετερόλογης έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον αρχικό μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) έχοντας τα αλλοένζυμα υποκλωνοποιημένα στους φορείς pEXP5-CT/TOPO® (hGSTP1*A) και pOXO4 (hGSTP1*B, hGSTP1*C) με τη χρήση υγρής προκαλλιέργειας. Τα συγκεκριμένα αλλοένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες της παρούσας εργασίας.

2.3.9. Προαγωγή ετερόλογης έκφρασης των αλλοενζύμων της hGSTP1 σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)

Α' τρόπος: Χρήση IPTG

Ο τρόπος αυτός επιλέγεται στην περίπτωση που επιθυμούμε την προαγωγή της έκφρασης με τη χρήση του IPTG. Συνεπώς, το προϊόν του μετασχηματισμού εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB όγκου V = 50 mL, με το κατάλληλο αντιβιοτικό (εδώ αμπικιλίνη) και αφήνεται για ολονύκτια επώαση (16 h) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 200 – 220 rpm. Στη συνέχεια, την επόμενη ημέρα, ολόκληρη η ποσότητα διοχετεύεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 450 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB μαζί με το αντιβιοτικό και επωάζουμε στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ελέγχουμε την απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm και μόλις η οπτική απορρόφηση φτάσει την τιμή OD = 0,6, τότε προσθέτουμε τον επαγωγέα της ετερόλογης έκφρασης (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Αφήνουμε την καλλιέργεια για τέσσερις ώρες υπό συνεχή ανάδευση στην ίδια θερμοκρασία και με το πέρας του χρονι-

κού διαστήματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 10 ή 20 min για παραλαβή των κυττάρων που αναπτύχθηκαν. Αφαιρώντας το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα φυλάσσονται στην κατάψυξη (-20°C) για μελλοντική χρήση.

B' τρόπος: Χρήση Λακτόζης

Ο τρόπος αυτός επιλέγεται στην περίπτωση που επιθυμούμε να αποφύγουμε την χρήση του IPTG ως μέσου επαγωγής της ετερόλογης έκφρασης. Στην προκειμένη περίπτωση, το προϊόν του μετασχηματισμού επιστρώνεται σε τρυβλίο και το τοποθετούμε στους 37°C για 16 h περίπου. Την επόμενη ημέρα, μονήρης αποικία εμβολιάζεται σε φιάλη με πλούσιο θρεπτικό μέσο (V = 500 mL), το οποίο περιέχει λακτόζη -ως επαγωγέα της έκφρασης- και αντιβιοτικό επιλογής. Η φιάλη με την εμβολιασμένη αποικία τοποθετείται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (200 – 220 rpm) και αφήνεται για επώαση 24 h. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 10 ή 20 min και η μάζα των κυττάρων που παραλαμβάνεται, εφόσον απορριφθεί το υπερκείμενο, φυλάσσεται στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.3.10. Διαπίδυση

Η μέθοδος της διαπίδυσης προηγείται του καθαρισμού του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου της τρανσφεράσης γλουταθειόνης από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3), αλλά και των αξιολογήσεων των πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης.

Γενικά, η διαπίδυση αποτελεί μια διαδικασία διαχωρισμού των μορίων ενός διαλύματος βάσει του βαθμού διάχυσής τους μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται συνήθως από κυτταρίνη, διαθέτει μικρού μεγέθους πόρους και επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν, αλλά δεν διαπερνάται από τα μόρια της πρωτεΐνης. Το διάλυμα που πρόκειται να υποστεί διαπίδυση, εισάγεται σε τέτοιου είδους μεμβράνη, η οποία και ασφαρίζεται πολύ καλά, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια του δείγματος. Το δείγμα με τη μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει ένα διαφορετικό διάλυμα ή πιθανόν και καθαρό δις απιονισμένο νερό.

Κατά τη διάρκεια της διαπίδυσης, τα μικρότερα μόρια, όπως το νερό, άλατα μικρού μοριακού βάρους και άλλα μικρά μόρια, τείνουν να κινούνται προς τα μέσα ή έξω της μεμβράνης, στην κατεύθυνση της μειούμενης συγκέντρωσης. Μεγαλύτερα μόρια, όπως πρωτεΐνες και μόρια DNA, δεν μπορούν να κινηθούν εκτός της μεμβράνης, λόγω των μεγαλύτερων διαστάσεών τους. Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται μέσα στη μεμβράνη ρυθ-

μίζεται με εξισορρόπηση έναντι του διαλύματος εκτός. Η διαδικασία αυτή διαρκεί σχεδόν μία ημέρα (24 ώρες) και λαμβάνει χώρα στους 4°C με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα και αργών περιστροφικών κινήσεων της μεμβράνης. Κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (<12 kDa).

Στην περίπτωση που η διαδικασία της διαπίδυσης *προηγείται του καθαρισμού του ενζύμου*, προετοιμάζεται ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) τελικής συγκέντρωσης 20 mM και pH = 7. Ο τελικός όγκος του διαλύματος αυτού εξαρτάται από την ποσότητα του κυτταρικού εκχυλίσματος που παραλαμβάνεται από τη λύση των κυττάρων που υπερπαράγουν το επιθυμητό ένζυμο.

Στην περίπτωση που η διαπίδυση εφαρμόζεται στο ενζυμικό παρασκεύασμα *μετά τον καθαρισμό* και πριν την έναρξη της αξιολόγησης των πεπτιδικών αναλόγων προετοιμάζεται ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) τελικής συγκέντρωσης 100 mM και pH = 6,5. Το είδος της συγκεκριμένης διαπίδυσης εφαρμόζεται αποσκοπώντας στην απομάκρυνση καταλοίπων του καθαρισμού (κυρίως υπολειμμάτων γλουταθειόνης από το διάλυμα των εκλούσεων), που συμπεριλαμβάνονται στο διάλυμα το καθαρισμένου ενζύμου, αλλά και στην εξισορρόπηση του διαλύματος του ενζύμου με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την φασματοσκοπική δοκιμή της ενζυμικής δραστηριότητας. Για την μεγαλύτερη επιτυχία της διαδικασίας αυτής το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης αντικαθίσταται από καινούριο μετά το πέρας του πρώτου εξαώρου, ενώ το καινούριο που προστίθεται αφήνεται έως την επόμενη ημέρα.

2.3.11. Καθαρισμός των αλλοενζύμων της hGSTP1*(A, B και C) με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας BES-GSH

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πιο εκλεπτυσμένη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού των ενζύμων. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στη βιολογική και μοριακή αναγνώριση (συγγένεια), η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με τη δυνατότητά τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρεπτό τρόπο συγκεκριμένα μόρια – δεσμευτές ή προσδέτες.

Εφόσον τα κύτταρα έχουν διαρραγεί και το ενζυμικό εκχύλισμα (crude) έχει υποβληθεί σε διαπίδυση, ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 min στις 8.000 rpm με σκοπό την απομάκρυνση των εναπομεινάντων κυτταρικών θραυσμάτων.

Ο καθαρισμός των αλλοενζύμων πραγματοποιείται σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) σε θερμοκρασία 4°C. Τα σφαιρίδια του προσροφητή συγγένειας φυλάσσονται στους 4°C σε διάλυμα 20% v/v αιθανόλης. Από εκεί, με ανακίνηση του δοχείου αποθήκευσης, για τη δημιουργία εναιωρήματος, λαμβάνουμε ποσότητα 2-3 mL και την μεταφέρουμε σε πλαστική στήλη καθαρισμού, η οποία περιέχει στη βάση της ημό για την συγκράτηση των σφαιριδίων. Ακολουθούν αρκετές πλύσεις της στήλης με δις-απιονισμένο νερό (ddH₂O) για την απομάκρυνση της αιθανόλης και, στη συνέχεια, ακολουθεί εξισορρόπηση αυτής με την προσθήκη 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ 20 mM και pH = 7.

Το επόμενο βήμα είναι η φόρτωση του ενζυμικού εκχυλίσματος που πρόκειται να καθαριστεί. Αναμένουμε για όσο χρόνο χρειαστεί έως ότου όλη η ποσότητα διαπεράσει τη στήλη και κατόπιν, με προσθήκη 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ 20 mM, pH = 7, εκπλένουμε τη στήλη για την απομάκρυνση των αδέσμευτων μορίων του εκχυλίσματος που δεν είχαν την ικανότητα να συγκρατηθούν από τα σφαιρίδια της στήλης καθαρισμού. Έπειτα, ακολουθούν οι εκκλούσεις με διάλυμα 20 mM KH₂PO₄, pH = 7 και 10 mM GSH, συνήθως 10 x 1 mL, όπου αναμένουμε και την παράλαβή του επιθυμητού ενζύμου σε καθαρή μορφή.

Σε επόμενο στάδιο, έπεται η αναγέννηση της στήλης εκπλένοντας το χρωματογραφικό υλικό με 10 mL από το κάθε διάλυμα αναγέννησης (Αναγέννηση 1 και 2) και, τέλος, λαμβάνει χώρα πλύση με ddH₂O και συντήρηση της στήλης στους 4°C.

2.3.12. Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST)

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



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

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα KH₂PO₄, 0,1 M, pH = 6,5 προθερμασμένο στους 37°C
- ❖ Γλουταθειόνη (GSH), 75 mM σε δις-απιονισμένο νερό (ddH₂O)

- ❖ 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), 30 mM σε αιθανόλη
- ❖ Ένζυμο, αραιωμένο ή μη, ανάλογα με τις μονάδες του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Η αντίδραση του προσδιορισμού πραγματοποιείται σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}} = 1 \text{ mL}$. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, σε έναν τυπικό προσδιορισμό προσθέτουμε τη GSH σε τελική συγκέντρωση 2,5 mM, το CDNB σε τελική συγκέντρωση 1 mM (ανακινούμε) και τέλος την κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος. Αναλόγως της ποσότητας των μονάδων ενζύμου που μπορεί να υπάρχουν στο ενζυμικό εκχύλισμα, καθορίζεται και η τελική ποσότητα που θα προστεθεί για να επιτρέψει τον σωστό προσδιορισμό της δραστηριότητας.

Υπολογισμός των ενζυμικών μονάδων (ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης)

Οι ενζυμικές μονάδες σε ένα δείγμα που περιέχει το μελετώμενο ένζυμο υπολογίζονται από τον ακόλουθο τύπο:

$$U/mL \text{ ή } \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V_t}{V_s} \cdot \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \text{αραιώση}$$

Όπου,

- ❖ U/mL ή $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ = οι ενζυμικές μονάδες ανά mL δείγματος
- ❖ $\Delta A/\Delta t$ = η κλίση της καμπύλης απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου ($t \rightarrow \text{min}$)
- ❖ V_t = ο συνολικός όγκος του δείγματος που υπάρχει στην κυψελίδα προσδιορισμού (mL)
- ❖ V_s = ο όγκος του ενζυμικού δείγματος (mL)
- ❖ ε = ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$)
- ❖ d = το μήκος της οπτικής διαδρομής (cm)

2.3.13. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών ενός δείγματος με τη μέθοδο κατά Bradford

Η χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού των ολικών πρωτεϊνών ενός δείγματος με τη μέθοδο Bradford, βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250* να αλλάζει χρώμα υπό όξινες συνθήκες. Έτσι, από την αρχική ερυθρή - καστανή απόχρωσή της, η χρωστική μεταβάλλεται σε πιο κυανή, εξαιτίας της πρόσδεσής της με την πρωτεΐνη του δείγματος που προσδιορίζεται. Η ελεύθερη χρωστική απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκό της με

την πρωτεΐνη 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 σε ένα φωτόμετρο.

Η αξιοπιστία της μεθόδου ενδείκνυται για πρωτεϊνικά δείγματα, των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,02 mg/mL έως και 0,20 mg/mL.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά, γίνεται η παρασκευή του πυκνού διαλύματος της χρωστικής. Η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50 % v/v) και στη συνέχεια, προστίθενται 100 mL διαλύματος πυκνού φωσφορικού οξέος (85 % v/v). Τα προαναφερθέντα συστατικά τοποθετούνται εντός σκοτεινού δοχείου, για προστασία από το φως, και το διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, αραιώνεται ποσότητα του πυκνού διαλύματος που παρασκευάστηκε σε αναλογία 1/4 (ένα μέρος διαλύματος προς τέσσερα μέρη νερού) και το προκύπτον διάλυμα διατηρείται και αυτό σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα έως και 24 h. Το άγνωστο δείγμα πρωτεϊνών προσδιορίζεται με την ανάμειξη 950 μL του αραιωμένου διαλύματος της χρωστικής και 50 μL δείγματος κατάλληλης συγκέντρωσης, ώστε στην κυψελίδα να περιέχονται 2 – 10 μg πρωτεΐνης. Σε περίπτωση μεγάλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης το δείγμα αραιώνεται ή στα 950 μL προστίθεται λιγότερη ποσότητα δείγματος και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τελικό όγκο 1 mL. Για τη λήψη των απορροφήσεων στα 595 nm προηγείται επώαση των δειγμάτων για 20 – 35 min.

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

Υπολογισμός των ολικών πρωτεϊνών

Οι ολικές πρωτεΐνες ενός δείγματος υπολογίζονται από τον τύπο του Bradford, ο οποίος έχει ως εξής:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \cdot \frac{V_t}{V_s} \cdot \text{αραιώση}$$

Όπου,

- ❖ c = η συγκέντρωση των πρωτεϊνών (mg/mL)
- ❖ A = η οπτική πυκνότητα του δείγματος
- ❖ ϵ = ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- ❖ l = το μήκος της οπτικής διαδρομής (cm)
- ❖ V_t = 50 μL (πάντα)
- ❖ V_s = η ποσότητα του δείγματος που προστέθηκε (μL)

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης που σχεδιάζεται από αλβουμίνη ορού μόσχου.

2.3.14. Υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA)

Η Ειδική Δραστηριότητα (Specific Activity – SA), αποτελεί ένα από τα μέτρα της ενζυμικής καθαρότητας και μας δείχνει πόσες μονάδες ενζύμου (U) υπάρχουν σε κάθε mg πρωτεΐνης και υπολογίζεται από τον επόμενο λόγο:

$$SA = \frac{\text{Ενζυμικές μονάδες ανά mL διαλύματος}}{\text{mg πρωτεΐνης ανά mL διαλύματος}}$$

2.3.15. Υπολογισμός της απόδοσης του καθαρισμού

Η απόδοση του καθαρισμού ενός ενζυμικού εκχυλίσματος προκύπτει από τον λόγο των ανακτημένων ενζυμικών μονάδων σε καθαρή μορφή προς την ποσότητα των ενζυμικών μονάδων που διαθέτουμε πριν τον καθαρισμό. Υπό μορφή ποσοστού, το παραπάνω πηλίκο πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα 100.

2.3.16. Υπολογισμός των φορών καθαρισμού ενός ενζύμου

Για τον υπολογισμό των φορών που καθαρίστηκε ένα ένζυμο, το οποίο βρίσκεται αναμειγμένο με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιούμε τον λόγο της ειδικής δραστηριότητας του εκλουσθέντος προϊόντος προς την ειδική δραστηριότητα του αρχικού εκχυλίσματος πριν το καθαρισμό.

2.3.17. Λυοφιλίωση

Μετά τη διαδικασία του καθαρισμού του ενζύμου, διαπιστώθηκε ότι το τελικό διάλυμα, που περιέχει το ένζυμο προς μελέτη, ήταν αρκετά αραιό ως προς την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες, για την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Για την συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση, απαιτούνται έως και 50 µg πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα, ενώ η μέγιστη ποσότητα που δύναται να χρησιμοποιηθεί ανέρχεται στα 20 µL.

Για τον λόγο αυτό, γίνεται χρήση της τεχνικής της λυοφιλίωσης, κατά την οποία αφαιρείται κάθε ίχνος νερού από το δείγμα με τη διαδικασία της εξάχνωσης, με αποτέλεσμα τη μείωση του τελικού του όγκου και τη συμπύκνωσή του. Συνεπώς, η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, μεταφέρεται σε δοχείο erpendorf, τοποθετείται στους -20°C για να παγώσει και στη συνέχεια, με μια βελόνα δημιουργούνται τρύπες στο πάμα του δοχείου, τις οποίες καλύπτουμε με παραφίλμ. Τα δείγματα, εν συνεχεία, τοποθετούνται σε ειδικές σφαιρικές φιάλες που εφαρμόζουν στο μηχάνημα της λυοφιλίωσης, όπου με εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών (-50 έως -80°C), χαμηλής πίεσης και κενού παραλαμβάνουμε σε στερεή μορφή το προϊόν, το οποίο και επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο.

2.3.18. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση αυτή λαμβάνει χώρα για να επιβεβαιωθεί ο βαθμός επιτυχίας του καθαρισμού του ενζύμου που πραγματοποιείται από μετασχηματισμένα κύτταρα *Escherichia coli* BL21 (DE3) και στα οποία έχει πραγματοποιηθεί έκφραση του ενζύμου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1). Για το σκοπό αυτό, επιλέγεται ένα προϊόν έκλουσης από τον καθαρισμό του κάθε αλλοενζύμου χρησιμοποιώντας, εκτός από τον μάρτυρα, και τα εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών (crudes) από τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία του δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS) ως αποδιατακτικού παράγοντα.

Αρχικά, προτού ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση, προετοιμάζεται η συσκευή στην οποία θα συντεθεί η πηκτή που μας ενδιαφέρει. Τα εξαρτήματα, στα οποία θα πήξει η πηκτή -τα τζαμάκια και ο υπόλοιπος εξοπλισμός- πλένονται πολύ καλά με νερό και σκουπίζονται με διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, στερεώνονται στη συσκευή κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργείται κενό μεταξύ τους (τα τζαμάκια είναι δύο) και ασφαλίζονται από τα πλαϊνά και τη βάση, έτσι ώστε να μην υπάρχει απορροή κατά την τοποθέτηση του διαλύματος της πηκτής. Το σωστό στήσιμο της συσκευής ελέγχεται με έγχυση νερού στο κενό που έχει δημιουργηθεί και αναμονή για παρα-

τήρηση τυχόν διαρροών. Αμέσως μετά τον έλεγχο, το νερό αφαιρείται εξ ολοκλήρου και στεγνώνει με τη χρήση και διηθητικού χαρτιού.

2.3.18.1. Η προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας της πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι η ετοιμασία της πηκτής διαχωρισμού των πρωτεϊνικών δειγμάτων (separating gel). Για το διάλυμα αυτό αναμειγνύονται 2.935 μL ddH₂O, 2.935 μL διαλύματος ακρυλαμίδης περιεκτικότητας 30 % w/v, 875 μL ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (separating buffer), 170 μL APS, 70 μL διαλύματος SDS 10 % w/v και 6,24 μL TEMED. Η προσθήκη του τελευταίου αντιδραστηρίου αποτελεί μαζί με το υπερθειικό αμμώνιο (APS), την απαρχή του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης και γι' αυτό η ανάδευση με τη χρήση μηχανικής πιπέτας γίνεται με γοργούς ρυθμούς και στη συνέχεια, μεταφέρεται στην ειδική εσοχή στη συσκευή μέχρι την κατάλληλη ένδειξη. Η διαδικασία αυτή δεν πρέπει να διαρκέσει περισσότερο των 2 min, καθώς το μείγμα αρχίζει να πήζει, λόγω του πολυμερισμού. Επειδή, το SDS δημιουργεί αφρό, μιας και κατατάσσεται στα απορρυπαντικά, μετά την προσθήκη του διαλύματος προσθέτουμε μικρή ποσότητα νερού για απομάκρυνση ή αποτροπή δημιουργίας φυσαλίδων. Στη συνέχεια, η πηκτή χρειάζεται 30 min περίπου άφεση σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει. Με το πέρας του διαστήματος αυτού, το νερό που προστέθηκε στο τέλος, αφαιρείται με τη χρήση διηθητικού χαρτιού.

Ακολούθως, ετοιμάζεται το διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel), το οποίο συνιστά μείγμα 3.450 μL ddH₂O, 625 μL ακρυλαμίδης σε περιεκτικότητας 30 % w/v, 625 μL ρυθμιστικού διαλύματος επιστοίβαξης (stacking buffer), 170 μL APS, 70 μL SDS 10 % w/v και 6,24 μL TEMED. Κατά τα γνωστά, ακολουθεί γρήγορη ανάδευση με μηχανική πιπέτα και λόγω του πολυμερισμού εισάγεται άμεσα και προσεκτικά στο σημείο που εναποτέθηκε το προηγούμενο διάλυμα πηκτής. Αμέσως μετά, προστίθεται το χτενάκι για το σχηματισμό των ειδικών εσοχών για την υποδοχή των δειγμάτων (τα «πηγαδάκια»). Σημειωτέον, ότι δεν θα πρέπει να δημιουργούνται φυσαλίδες μέσα στα «πηγαδάκια». Ακολουθεί αναμονή 20 – 30 min για το σχηματισμό της πηκτής. Εφόσον πήξει η πηκτή, με πολλή προσοχή αφαιρείται το χτενάκι για να απελευθερωθούν τα πηγαδάκια και είναι έτοιμη προς χρήση.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, όπως το TEMED ή η ακρυλαμίδα, απαιτούν τη χρήση του κατάλληλου προστατευτικού εργαστηριακού εξοπλισμού, προς αποφυγή ατυχημάτων, λόγω της επικινδυνότητας που παρουσιάζουν για την υγεία.

2.3.18.2. Ετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης

Κατά τη διάρκεια της πήξης της πηκτής επιστοιβάξης, ετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα τρεξίματος (running buffer) της ηλεκτροφόρησης, το οποίο το έχουμε έτοιμο και το αραιώνουμε. Συνεπώς, σε 450 mL ddH₂O προσθέτουμε 50 mL από το διάλυμα τρεξίματος. Από τη συσκευή που παρασκευάστηκε η πηκτή της ηλεκτροφόρησης, παίρνουμε μαζί με τα τζαμάκια το σύστημα της πηκτής και το προσαρμόζουμε στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης στερεώνοντάς το καλά. Στη συνέχεια, πληρώνουμε τη συσκευή με το ρυθμιστικό διάλυμα τρεξίματος εμπρός και πίσω της συσκευής, καθώς και πάνω και πίσω από τα τζαμάκια. Η συσκευή είναι έτοιμη για φόρτωση των δειγμάτων.

2.3.18.3. Προετοιμασία των δειγμάτων

Βασική προϋπόθεση για να προχωρήσει η ηλεκτροφόρηση είναι να γνωρίζουμε τί ποσότητα πρωτεΐνης διαθέτουμε στο κάθε δείγμα, καθώς για τα δείγματα που έχουμε λάβει από τον καθαρισμό των ενζύμων απαιτούνται 20 µg πρωτεΐνης και για τα δείγματα των ολικών πρωτεϊνών (crudes) χρειάζονται 50 µg πρωτεΐνης. Για τη συλλογή των ποσοτήτων αυτών, προηγείται ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια, με υπολογισμούς βρίσκεται η απαιτούμενη ποσότητα από τα διαθέσιμα δείγματα. Επειδή οι ποσότητες που τοποθετούνται στα πηγαδάκια της πηκτής περιορίζονται στα 20 µL και οι υπολογιζόμενες ποσότητες είναι μεγαλύτερες, προηγείται λυοφιλίωση. Τα δείγματα από τα εκχυλίσματα, όπως τα παραλαμβάνουμε μετά τη θραύση των κυττάρων (crudes) παραμένουν ως έχουν.

Έχοντας έτοιμα τα δείγματα μετά τη λυοφιλίωση, τα αραιώνουμε με 10 µL ρυθμιστικού διαλύματος χρωστικής φόρτωσης (loading buffer) και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τα 20 µL (δηλ. 10 µL). Το ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής φόρτωσης, αραιώνεται με β-μερκαπτοαιθανόλη με σκοπό την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Το ίδιο γίνεται και για τα εκχυλίσματα (crudes), όπου υπολογίζεται η απαιτούμενη ποσότητα και στη συνέχεια, προσθέτουμε 10 µL χρωστικής και νερό έως τον τελικό όγκο 20 µL. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και στροβίλισμα (σπιν).

Τα δείγματα στη συνέχεια, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 95°C για 5 min, ώστε να γίνει αποδιάταξη των δομών των πρωτεϊνών και στη συνέχεια, εφαρμόζεται εκ νέου έντονη ανάδευση και σπιν, αφήνονται για λίγο στον πάγο και είναι έτοιμα προς φόρτωση στην πηκτή της πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί το φόρτωμα των 20 µL του κάθε δείγματος, ενώ χρησιμοποι-

είται και ένας μάρτυρας (Protein Prestained Marker) για με γνωστά μεγέθη δειγμάτων, από τον οποίο φορτώνουμε 15 μL .

2.3.18.4. Έναρξη και πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να ξεκινήσει, εφόσον τα ηλεκτρόδια τοποθετηθούν στις σωστές θέσεις και στη συνέχεια, τα συνδέσουμε στη συσκευή παροχής ρεύματος. Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 20 mA και αφήνουμε τη διαδικασία να τρέξει για όση ώρα χρειαστεί. Στο τέλος, μεταφέρουμε με πολλή προσοχή, ώστε να μην καταστραφεί η πηκτή, το ηλεκτροφόρημα σε πλαστικό δοχείο, όπου εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45 % v/v), οξικό οξύ (7 % v/v) και χρωστική *Coomassie Brilliant Blue R-250* για περίπου 20 min.

Στη συνέχεια, επιστρέφουμε το διάλυμα της χρωστικής στο δοχείο της και το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως και εμβαπτίζουμε, στη συνέχεια, με το πρώτο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining I), το οποίο αποτελείται από μεθανόλη 40 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v και το αφήνουμε υπό συνεχή ανάδευση για χρονικό διάστημα 1 h. Μετά το στάδιο αυτό, απορρίπτουμε το διάλυμα και εμβαπτίζουμε με το δεύτερο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining II), αποτελούμενο από μεθανόλη 5 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v και το αφήνουμε για ολονύκτια επώαση υπό ανακίνηση. Μετά και από αυτό το βήμα, το ηλεκτροφόρημα είναι έτοιμο για παρατήρηση.

2.3.19. Σάρωση των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης για πιθανή ιδιότητα υποστρώματος ή αναστολέα

2.3.19α. Σάρωση για πιθανή ιδιότητα υποστρώματος

Η σάρωση των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης για την πιθανή ιδιότητα υποστρώματος, πραγματοποιήθηκε για τα πεπτίδια του **Πίνακα 2.1**, τα οποία περιέχουν κυστεΐνη στο μόριό τους. Η αξιολόγηση των ενώσεων αυτών αφορά στα τρία αλλοένζυμα (A, B και C) του ισοενζύμου P1 της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου.

Η συγκεκριμένη αξιολόγηση πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά σε τελικό όγκο 1 mL σε πλαστική κυψελίδα μιας χρήσης, η οποία περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KH_2PO_4) 0,1 M pH = 6,5, διάλυμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB) σε τελική συγκέντρω-

ση 1 mM, πεπτιδικό ανάλογο (PA) σε τελική συγκέντρωση όση και η προσδιορισμένη K_m του ενζύμου για το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου (GSH), καθώς και το ένζυμο (hGSTP1*A, hGSTP1*B ή hGSTP1*C) σε ποσότητα ικανή να δώσει μεταβολή απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου ($\Delta A/\Delta t$) $\approx 0,06$ σε μήκος κύματος $\lambda = 340$ nm. Στον μάρτυρα αντί για πεπτιδικό ανάλογο χρησιμοποιείται το φυσικό υπόστρωμα GSH στην αντίστοιχη συγκέντρωση της K_m , ενώ στην περίπτωση που κάποιο από τα συνθετικά πεπτίδια είναι διαλυτό σε DMSO, στον μάρτυρα χρησιμοποιείται η αντίστοιχη ποσότητα DMSO που θα χρησιμοποιείτο στην περίπτωση της αξιολόγησης ενός τέτοιου πεπτιδικού αναλόγου. Όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C για χρονικό διάστημα $t = 1$ min.

Ο **Πίνακας 2.6** παρουσιάζει τη σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων στην κυψελίδα.

Πίνακας 2.6. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων κατά την αξιολόγηση υποστρωμάτων.

	1	2	3	4	5	6
Μάρτυρας	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4	GSH	-	hGSTP1	Αναμονή για 1 min	CDNB
Μάρτυρας με DMSO		GSH	DMSO			
Πεπτιδικό Ανάλογο		PA	-			

2.3.19β. Σάρωση για πιθανή ιδιότητα αναστολέα

Η σάρωση των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης για ανίχνευση πιθανής ιδιότητας αναστολέα πραγματοποιήθηκε για όλες τις ενώσεις που περιγράφονται στον **Πίνακα 2.1** για τα τρία αλλοένζυμα που μελετάμε.

Η αξιολόγηση λαμβάνει χώρα φασματοφωτομετρικά σε τελικό όγκο 1 mL σε πλαστική κυψελίδα μιας χρήσης, χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια και συνθήκες όπως και στην **παράγραφο §2.3.19α**. Η διαφορά, στην προκειμένη περίπτωση, είναι στη συγκέντρωση του πεπτιδικού αναλόγου, η οποία είναι 25 μM (5 μL από στοκ 5 mM), καθώς είναι ο υποψήφιος αναστολέας, ενώ η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη GSH στη συγκέντρωση της K_m του ενζύμου.

Ο Πίνακας 2.7 που ακολουθεί παρουσιάζει τη σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 2.7. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων κατά την αξιολόγηση αναστολέων.

	1	2	3	4	5	6
Μάρτυρας	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4	CDNB	-	hGSTP1	Αναμονή για 1 min	GSH
Μάρτυρας με DMSO		DMSO	CDNB			
Πεπτιδικό Ανάλογο		CDNB	PA			

2.3.19γ. Υπολογισμοί της Σχετικής/Παραμένουσας Δραστικότητας (Fractional/Remaining Activity %) και της Ενζυμικής Αναστολής (Enzyme Inhibition %)

Θεωρώντας ως 100% τους ενζυμικούς προσδιορισμούς χωρίς την παρουσία πεπτιδικού αναλόγου είτε ως αναστολέα είτε ως υποστρώματος υπολογίζουμε την Σχετική/Παραμένουσα Δραστικότητα από το λόγο της μεταβολής της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου προς το λόγο της μεταβολής της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου απουσία του πεπτιδικού αναλόγου.

$$FA/RA (\%) = \left(\frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{με πεπτιδίο}}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)_{\text{χωρίς πεπτιδίο}}} \right) \cdot 100$$

Στην προκειμένη περίπτωση, σαν Σχετική Δραστικότητα (FA %) αναφερόμαστε στο υπολογιζόμενο ποσοστό όταν αξιολογούμε ενώσεις για πιθανή ιδιότητα υποστρώματος, ενώ σαν Παραμένουσα Δραστικότητα (RA %) αναφερόμαστε στην αξιολόγηση ενώσεων για πιθανή ιδιότητα αναστολέα.

Τέλος, η Ενζυμική Αναστολή (EI %) προκύπτει από την παρακάτω διαφορά:

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

2.3.20. Κινητική μελέτη υπολογισμού της σταθεράς K_m για πεπτιδικά ανάλογα ως υποψήφια υποστρώματα, καθώς και για τα υποστρώματα GSH και CDNB των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C.

Ο σχεδιασμός όλων των γραφημάτων της κινητικής αυτής μελέτης πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής *GraFit 3.0*. Τα πειράματα της κινητικής μελέτης, όπως και αυτά της σάρωσης των πεπτιδικών αναλόγων, πραγματοποιήθηκαν με τριπλή επανάληψη στο πρόγραμμα *UVKinLab* σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης με απορροφήσεις σε $\lambda = 340 \text{ nm}$.

2.3.20α. Υπολογισμός K_m ως προς GSH και CDNB για τα αλλοένζυμα που προέκυψαν από τις υποκλωνοποιήσεις.

Μετά την εισαγωγή των γονιδίων των τριών αλλοενζύμων που μας ενδιαφέρουν, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή κινητικών μελετών για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων των συγκεκριμένων ενζύμων σχετικά με τα υποστρώματα με τα οποία απασχολούμαστε, δηλ. τη GSH και το CDNB.

Οι προσδιορισμοί αυτοί πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 1 mL σε πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης, σε θερμοκρασία 25°C για χρονικό διάστημα 1 min. Οι κυψελίδες περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 0,1 M pH = 6,5, GSH ή CDNB σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση, ανάλογως της K_m που μας ενδιαφέρει και κατάλληλη ποσότητα ενζύμου, ώστε να δίνει τιμή $\Delta A/\Delta t$ ικανή να μας επιτρέψει την εφαρμογή ιδιαίτερα χαμηλών συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων αν αυτό απαιτηθεί.

2.3.20.β. Υπολογισμός K_m ως προς τα επιλεγμένα πεπτιδικά ανάλογα που προέκυψαν κατά τη σάρωση των ενώσεων.

Από τη σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης που πραγματοποιήσαμε επιλέγουμε ορισμένα από αυτά, τα οποία και δίδουν αξιόλογη Σχετική Δραστικότητα (FA %) για τον υπολογισμό των K_m και των αντίστοιχων κινητικών παραμέτρων τους.

Οι μελέτες αυτές, υπολογίστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο όπως και πριν. Η διαφορά έγκειται στην αντικατάσταση της GSH από το αντίστοιχο πεπτιδικό ανάλογο (PA) κατά τη διάρκεια των προσδιορισμών.

Ο **Πίνακας 2.8** συνοψίζει τη σειρά των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις κινητικές μελέτες.

Πίνακας 2.8. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων κατά τις κινητικές αναλύσεις.

	1	2	3	4	5
Μάρτυρας (κλασική δοκιμή)	Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4	GSH (2,5 mM)	hGSTP1	Αναμονή 1 min	CDNB (1 mM)
Κινητική ως προς GSH		GSH (μεταβαλλόμενη συγκέντρωση)			CDNB (σταθερή συγκέντρωση 1 mM)
Κινητική ως προς PA		PA (μεταβαλλόμενη συγκέντρωση)			CDNB (σταθερή συγκέντρωση 1 mM)

2.3.21. Χρήση της γλυκερόλης ως μέσο μακροχρόνιας αποθήκευσης

2.3.21α. Αποθήκευση κυττάρων υγρής καλλιέργειας στους -80°C

Μετά την ανάπτυξη κάποιας καλλιέργειας, είναι επιθυμητή η αποθήκευση μερικής ποσότητας αυτής σε χαμηλή θερμοκρασία, αλλά και σε μορφή τέτοια που να διατηρεί τη ζωτικότητα των κυττάρων της. Γι' αυτό το σκοπό, σε ένα αποστειρωμένο δοχείο erpendorf μεταφέρονται 500 μL από την καλλιέργεια που θέλουμε να διαφυλάξουμε και προστίθεται ίσος όγκος αποστειρωμένου διαλύματος γλυκερόλης 50 % v/v. Μετά από ελαφρά ανάδευση ασφαλίζουμε το δοχείο με παραφίλμ και το αποθηκεύουμε στους -80°C .

2.3.21β. Αποθήκευση των προϊόντων καθαρισμού του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου

Μετά τον καθαρισμό ενζύμου, που έχει εκφραστεί ετερόλογα σε κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί χρειάζεται η φύλαξή του σε χαμηλή θερμοκρασία. Για να αποφευχθεί η απώλεια της λειτουργικότητας λόγω μετουσίωσης στις χαμηλές θερμοκρασίες, προστίθεται σταγόνα σταγόνα ποσότητα γλυκερόλης 99,5 % v/v ίση με την ποσότητα του προϊόντος της έκλουσης που υπάρχει στο δοχείο erpendorf. Στη συνέχεια, ακολουθεί ασφάλιση των erpendorf με παραφίλμ και αποθήκευσή τους στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.3.22. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον τρόπο της μετατροπής κυττάρων -είτε για υποκλωνοποίηση είτε για έκφραση- σε δεκτικά για μετασχηματισμό.

Κύτταρα, ήδη δεκτικά, επιστρώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB απουσία αντιβιοτικού. Παράλληλα, γίνεται έλεγχος των κυττάρων σε τρυβλίο παρουσία αντιβιοτικού για ανίχνευση πιθανών επιμολύνσεων. Τα τρυβλία αφήνονται στους 37°C ολονυκτίως για επώαση.

Την επόμενη ημέρα, από το τρυβλίο που δεν έχει αντιβιοτικό, μονήρης αποικία εμβολιάζεται σε δοχείο falcon που περιέχει αποστειρωμένο θρεπτικό LB άνευ αντιβιοτικού και αφήνεται για 16 h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm.

Την τρίτη ημέρα, 1 mL της προκαλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί μεταφέρεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 mL θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια αφήνεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση έως η οπτική απορρόφηση να λάβει τιμή OD = 0,5 στα 550 nm. Στη συνέχεια, η φιάλη με την καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο (4°C) για 10 min. Έπειτα, η καλλιέργεια μοιράζεται σε τέσσερα αποστειρωμένα δοχεία falcon, τα οποία ήταν τοποθετημένα στον πάγο προηγουμένως, και γίνεται η πρώτη φυγοκέντρηση στις 4.500 rpm για 5 min σε θερμοκρασία 4°C.

Με την αφαίρεση του υπερκειμένου θρεπτικού διαλύματος, πραγματοποιείται απανεναιώρηση των κυττάρων σε 50 mL διαλύματος CaCl₂ 25 mM. Τα κύτταρα αφήνονται στους 4°C για 10 min και αμέσως μετά, ακολουθεί φυγοκέντρηση 4.500 rpm για 5 min σε θερμοκρασία 4°C. Απορρίπτοντας το υπερκείμενο διάλυμα, επανεναιωρούμε τα κύτταρα σε 6,65 mL διαλύματος CaCl₂ 75 mM. Τα αφήνουμε για λίγο στον πάγο και, στη συνέχεια, προσθέτουμε γλυκερόλη 99,5 % v/v, ώστε να είναι σε ποσοστό 15 % στο κάθε falcon. Μετά από 10 min, μοιράζουμε τις ποσότητες αυτές σε αποστειρωμένα δοχεία erpendorf και αποθηκεύουμε στους -80°C. Επιστρώνουμε και πάλι ένα τρυβλίο με αντιβιοτικό για να βεβαιώσουμε την αποφυγή επιμολύνσεων.

2.3.23. Σύνθεση του προσροφητή συγγενείας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH)

Η παρακάτω μέθοδος, αναφέρεται στη σύνθεση του εν λόγω προσροφητή για την πραγματοποίηση του καθαρισμού των ετερόλογα εκφρασμένων αλλοενζύμων της hGSTP1 μέσω χρωματογραφίας συγγένειας.

Σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose – CL6B) μάζας περίπου 20 g ζυγίζονται και εκπλένονται με 200 mL δις απιονισμένου νερού (ddH₂O) με διήθηση κάνοντας χρήση ηθμού με αντλία κενού. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια μεταφέρονται σε γυάλινο δοχείο, όπου και επανεναιωρούνται σε διάλυμα NaOH 0,6 M προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη. Το εναιώρημα αφήνεται για 3 h υπό ήπια περιστροφική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, στην ενεργοποιημένη αγαρόζη προστίθενται 4 mL 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα και η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 h υπό ήπια περιστροφική ανάδευση. Με το πέρας και αυτού του χρονικού διαστήματος τα σφαιρίδια διηθούνται και πλένονται με ddH₂O.

Ακολούθως, στα σφαιρίδια προστίθεται διάλυμα GSH (400 μmol), το οποίο είναι αναμειγμένο με 10 mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου (π.χ. Na₂HPO₄) 1 M, pH = 8. Ο προσροφητής που ετοιμάζουμε έχει υποκαταστάτη 20 μmol GSH/g σφαιριδίων αγαρόζης. Η αντίδραση αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 42 h υπό ήπια περιστροφική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα σφαιρίδια διηθούνται και εκπλένονται με δεκαπλάσιο όγκο ddH₂O (100 mL) και αποθηκεύονται στους 4°C εντός διαλύματος αιθανόλης 20% v/v.

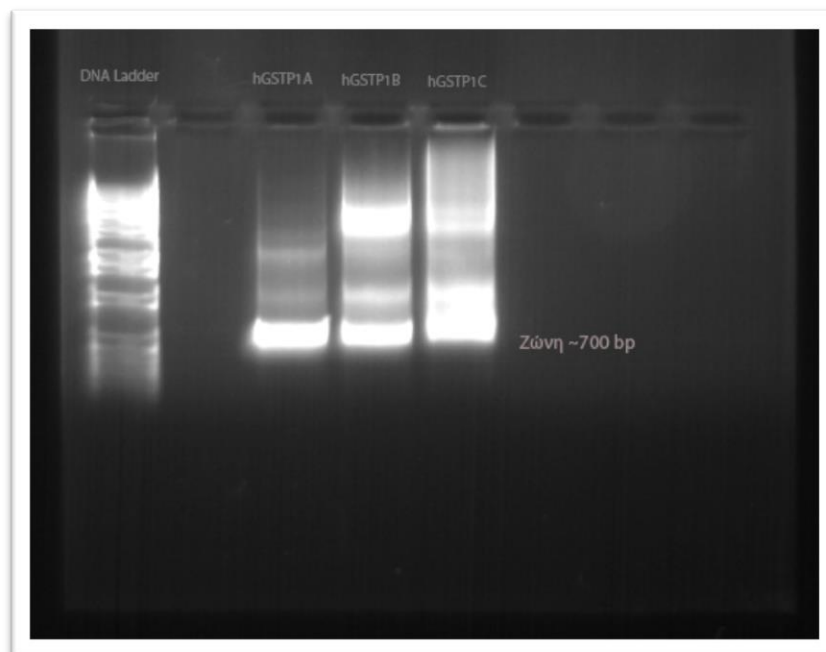
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Η αρχική PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποίησε σαν μήτρα τα γονίδια των αλλοένζυμων της hGSTP1, το οποία ήταν ήδη εισηγμένα σε πλασμιδιακούς φορείς. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, φάνηκε ότι υβρίδισαν και σε άλλες περιοχές των πλασμιδίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση περισσότερων της μιας ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτική αγαρόζη (*Εικόνα 3.1*).

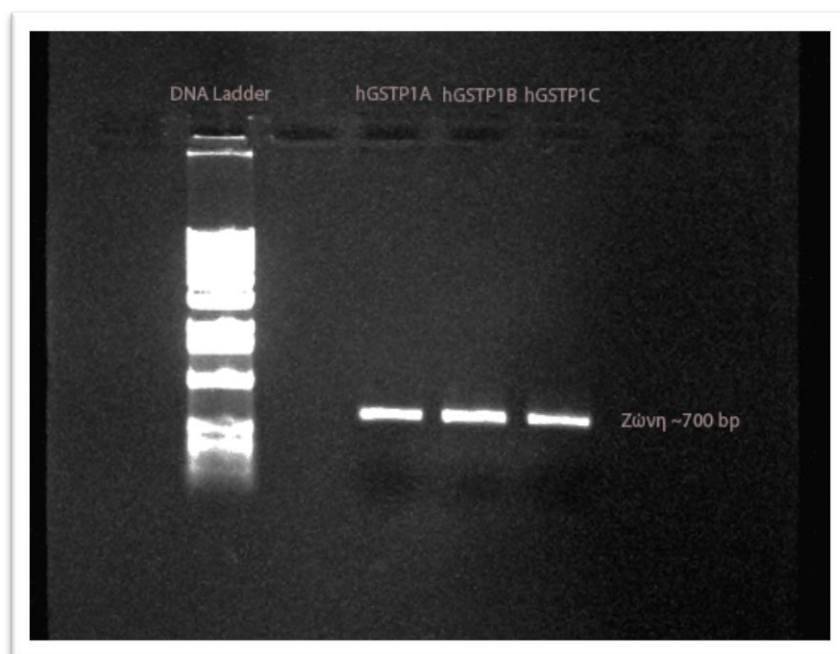


Εικόνα 3.1. Εικόνα της πηκτικής αγαρόζης, η οποία παρουσιάζει το προϊόν της PCR με τα αλλοένζυμα της hGSTP1 και τις περισσότερες του επιθυμητού ζώνες που προέκυψαν λόγω υβριδισμού των εκκινητών σε διάφορες θέσεις.

3.2. Απομόνωση της επιθυμητής ζώνης DNA από την αρχικό προϊόν της PCR

Μετά την ανίχνευση περισσότερων ζωνών DNA στην πηκτική αγαρόζη του προϊόντος PCR για την ενίσχυση των γονιδίων της hGSTP1, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από την επιθυμητή ζώνη (περίπου 600-700 bp), κάνοντας απόσπαση του τμήματος της πηκτικής που

μας ενδιαφέρει και χρησιμοποιώντας το σχετικό εμπορικό κιτ για απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction) (**Εικόνα 3.2**).



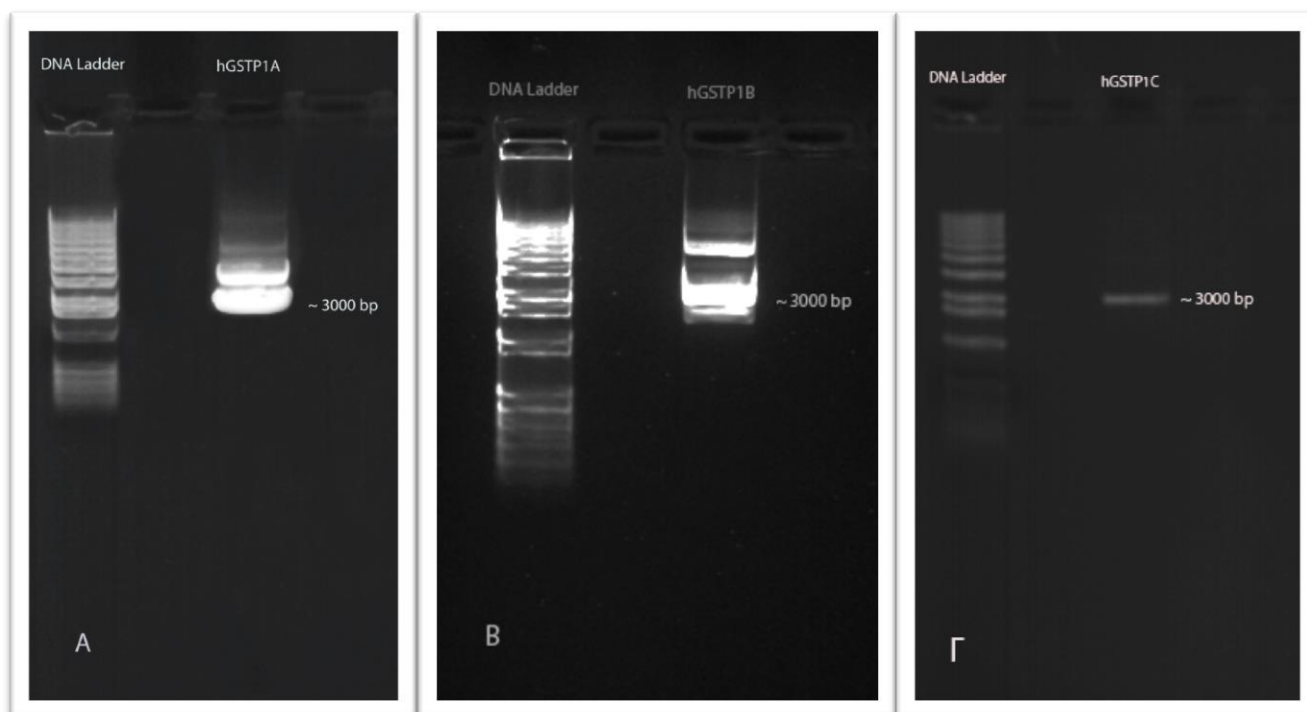
Εικόνα 3.2. Το αποτέλεσμα της απομόνωσης μιας ζώνης DNA από το αρχικό προϊόν της PCR με την εφαρμογή gel extraction.

3.3. Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA για αλληλούχηση

Η μέθοδος της κλωνοποίησης σε δεκτικά για μετασηματισμό κύτταρα NEB Turbo ή DH5a, είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αποικιών, οι οποίες με τη σειρά τους υποβλήθηκαν σε προαγωγή ετερόλογης έκφρασης των ανασυνδυασμένων ενζύμων σε μικρή κλίμακα. Η σάρωση των αποικιών αυτών, όπως περιγράφεται στην **παράγραφο §2.3.12**, έδειξε πως σε ποιες περιπτώσεις είχαμε επιτυχή είσοδο του επιθυμητού γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

Συνεπώς, το επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* DH5a ή NEB Turbo, κάνοντας χρήση του αντίστοιχου εμπορικού κιτ.

Η **Εικόνα 3.3** που ακολουθεί παρουσιάζει ενδεικτικά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις τρεις πραγματοποιήσεις της υποκλωνοποίησης των hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C ξεχωριστά.



Εικόνα 3.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένες αποικίες με τα αλλοένζυμα hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C να έχουν εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

3.4. Καθαρισμός των αλλοενζύμων της τρανσφεράσης γλουταθειόνης P1

Τα αλλοένζυμα hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C, εφόσον βεβαιώθηκε η εισαγωγή τους στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® με αλληλούχηση του πλασμιδίου, μεταφέρθηκαν στα εκφραστικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), στα οποία και προήχθη η ετερόλογος έκφρασή τους. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα των κυττάρων που παρήχθη από τη λύση τους με τη βοήθεια συστήματος υπερήχων, υποβλήθηκε σε καθαρισμό σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του καθαρισμού μέσω της μεθόδου αυτής, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του καθαρισμού των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C.

Ένζυμο	Ειδική Δραστικότητα (SA) U/mg	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
hGSTP1*A	164,4	7,1	55,0
hGSTP1*B	32,1	386,4	90,1
hGSTP1*C	21,7	83,5	80,0

Ακόμα, τα αποτελέσματα των σαρώσεων των πεπτιδικών αναλόγων, που παρατίθενται στους επόμενους πίνακες, έχουν πραγματοποιηθεί μετά από έκφραση και καθαρισμό των αλλοενζύμων

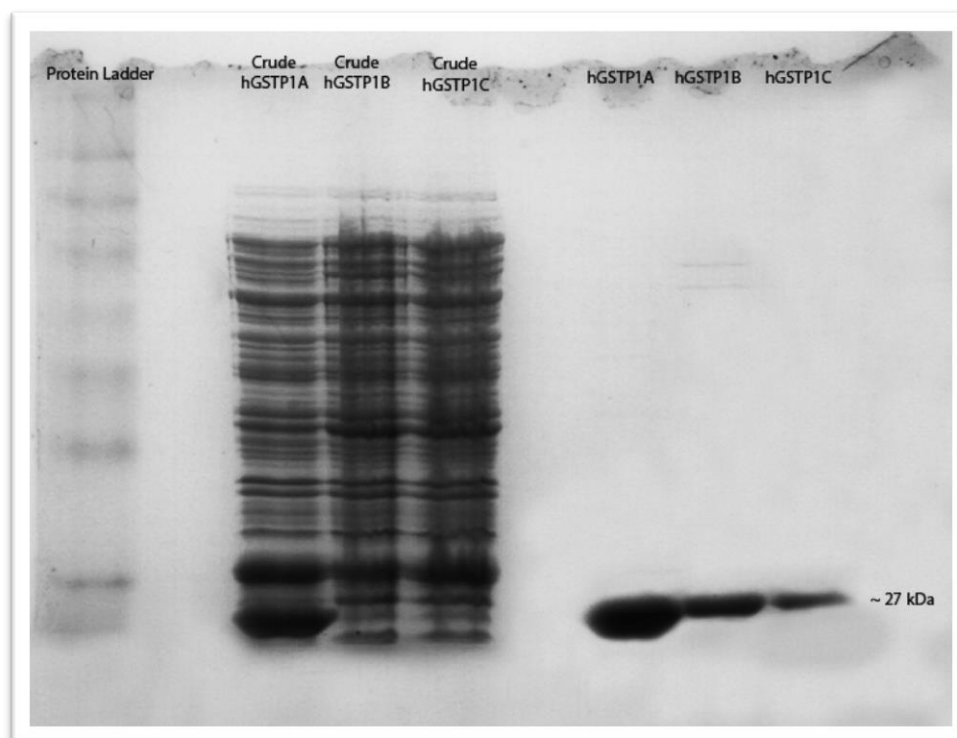
στα πλασμίδια που ευρίσκονταν πριν από τις υποκλωνοποιήσεις. Ο Πίνακας 3.2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των καθαρισμών των αλλοενζύμων αυτών.

Πίνακας 3.2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του καθαρισμού των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C προ των υποκλωνοποιήσεων στον φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

Ένζυμο	Ειδική Δραστικότητα (SA) U/mg	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
hGSTP1*A	6,5	260,4	55,7
hGSTP1*B	38,2	205,5	100,0
hGSTP1*C	30,8	55	75,0

3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου των καθαρισμένων αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C

Μετά τον καθαρισμό των τριών αλλοενζύμων σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για να διαπιστωθεί η καθαρότητα του ενζυμικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στις αξιολογήσεις των πεπτιδικών αναλόγων. Η Εικόνα 3.4 παρουσιάζει την εικόνα του ηλεκτροφορήματος.



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C, μετά την εισαγωγή τους στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

3.6. Σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης ως πιθανών υποστρωμάτων ή αναστολέων των αλλοενζύμων A, B και C του ισοενζύμου P1 της τρανσφεράσης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C).

Η βιβλιοθήκη των πεπτιδικών αναλόγων που περιγράφεται στον **Πίνακα 2.1** της **παράγραφου §2.1.3** αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητά της να είναι πιθανό υπόστρωμα (αντί της γλουταθειόνης, GSH) και ως προς την ικανότητα να είναι αναστολέας των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης σάρωσης παρουσιάζονται στους επόμενους τρεις πίνακες. (**Πίνακες 3.3, 3.4, 3.5**)

Επεξήγηση συμβόλων των ακόλουθων πινάκων:

- ❖ ^αRA% = Εναπομείνασα ενζυμική δραστικότητα
- ❖ ^βFA% = Σχετική ενζυμική δραστικότητα
- ❖ Τα αποτελέσματα είναι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων των αξιολογήσεων

Πίνακας 3.3. Σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων με το αλλοένζυμο hGSTP1*A.

Κωδικός Πεπτιδικού Αναλόγου (PA)	Μοριακό βάρος PA (g/mol)	Αλλοένζυμο: hGSTP1-A	
		K _m ^{GSH} = 0,3 ± 0,02 mM	
		Αναστολέας RA (%) ^α (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] = 0,3 mM, [πεπτιδικό ανάλογο] = 25 μM)	Υπόστρωμα FA (%) ^β (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] ή [πεπτιδικό ανάλογο] = 0,3 mM)
Ομάδα A			
I pGlu-Cys-Gly	289,31	-	11,5 ± 10,4
II Tic-Cys-Gly	336,0	-	41,3 ± 2,9
III Sar-Cys-Gly	249,49	-	15,8 ± 3,8
IV Hyp-Cys-Gly	290,0	-	39,5 ± 3,8
V Ac-γ-Glu-Cys-Gly	349,36	102,3 ± 2.8	0
VI NMe-Glu-Cys-Gly	321,35	-	3,9 ± 4,7
VII Pro-Cys-Gly	275,32	-	21,6 ± 4,0

Ομάδα Β			
VIII γ-Glu-Met-Gly	335,38	79,4 ± 1,1	-
IX γ-Glu-Thi-Gly	357,38	67,4 ± 4,2	-
X γ-Glu-Cys(tButhio)-Gly	395,49	85,6 ± 0,4	-
XI γ-Glu-Cys(Acm)-Gly	378,4	85,2 ± 1,7	-
XII γ-Glu-NMeCys-Gly	321,35	100,0	0
Ομάδα Γ			
XIII γ-Glu-Cys-Nva	349,4	-	16,0 ± 2,7
XIV γ-Glu-Cys-Nle	363,43	-	26,4 ± 2,7
XV γ-Glu-Cys-Sar	321,35	-	17,0 ± 4,3
XVI γ-Glu-Cys-Aib	335,38	100,0	0
XVII γ-Glu-Cys-a-t-butyl-Gly	363,15	100,0	0
Ομάδα Δ			
XVIII pGlu-Cys(Trt)-Gly	531,62	82,3 ± 0,2	-
XIX Sar-Cys(Trt)-Gly	491,60	100,0	-
XX Tic-Cys-Ala	351,42	100,0	0
XXI Hyp-Cys-Ala	305,35	98,7 ± 2,0	0
XXII Gly-Cys-Hyp	291,32	87,4 ± 0,2	0
XXIII Tic-Cys-Aib	365,45	80,1 ± 4,8	0
XXIV Tic-Cys(Acm)-Gly	408,47	68,5 ± 4,5	0
XXV Tic-Cys-Sar	351,42	53,3 ± 0,0	0

Πίνακας 3.4. Σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων με το αλλοένζυμο hGSTP1*B.

Κωδικός Πεπτιδικού Αναλόγου (PA)	Μοριακό βάρος PA (g/mol)	Αλλοένζυμο: hGSTP1-B	
		$K_m^{GSH} = 0,074 \pm 0,008 \text{ mM}$	
		Αναστολέας RA (%) ^α (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] = 0,074 mM, [πεπτιδικό ανάλογο] = 25 μM)	Υπόστρωμα FA (%) ^β (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] ή [πεπτιδικό ανάλογο] = 0,074 mM)

Ομάδα Α			
I pGlu-Cys-Gly	289,31	79,2 ± 4,8	0
II Tic-Cys-Gly	336,0	83,1 ± 1,5	0
III Sar-Cys-Gly	249,49	83,5 ± 1,6	0
IV Hyp-Cys-Gly	290,0	89,9 ± 3,2	0
V Ac-γ-Glu-Cys-Gly	349,36	85,3 ± 1,2	0
VI NMe-Glu-Cys-Gly	321,35	81,0 ± 1,4	0
VII Pro-Cys-Gly	275,32	82,6 ± 3,0	0
Ομάδα Β			
VIII γ-Glu-Met-Gly	335,38	70,1 ± 0,8	-
IX γ-Glu-Thi-Gly	357,38	92,5 ± 3,9	-
X γ-Glu-Cys(tButhio)-Gly	395,49	79,5 ± 3,7	-
XI γ-Glu-Cys(Acm)-Gly	378,4	64,0 ± 2,9	-
XII γ-Glu-NMeCys-Gly	321,35	100,0	0
Ομάδα Γ			
XIII γ-Glu-Cys-Nva	349,4	80,1 ± 4,8	0
XIV γ-Glu-Cys-Nle	363,43	80,9 ± 4,1	0
XV γ-Glu-Cys-Sar	321,35	-	60,8 ± 3,3
XVI γ-Glu-Cys-Aib	335,38	82,7 ± 1,9	0
XVII γ-Glu-Cys-a-t-butyl-Gly	363,15	80,4 ± 5,0	0
Ομάδα Δ			
XVIII pGlu-Cys(Trt)-Gly	531,62	95,8 ± 2,1	-
XIX Sar-Cys(Trt)-Gly	491,60	102,3 ± 5,0	-
XX Tic-Cys-Ala	351,42	100,0 ± 1,1	0
XXI Hyp-Cys-Ala	305,35	81,3 ± 1,0	0
XXII Gly-Cys-Hyp	291,32	81,6 ± 5,0	0
XXIII Tic-Cys-Aib	365,45	75,2 ± 5,0	0

XXIV Tic-Cys(Acm)-Gly	408,47	84,2 ± 5,0	0
XXV Tic-Cys-Sar	351,42	72,0 ± 2,2	0

Πίνακας 3.5. Σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων με το αλλοένζυμο hGSTP1*C.

Κωδικός Πεπτιδικού Αναλόγου (PA)	Μοριακό βάρος PA (g/mol)	Αλλοένζυμο: hGSTP1-C	
		Km ^{GSH} = 0,15 ± 0,01 mM	
		Αναστολέας RA (%) ^α (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] = 0,15 mM, [πεπτιδικό ανάλογο] = 25 μM)	Υπόστρωμα FA (%) ^β (Assays: [CDNB] = 1 mM, [GSH] ή [πεπτιδικό ανάλογο] = 0,15 mM)
Ομάδα Α			
I pGlu-Cys-Gly	289,31	80,0 ± 3,6	0
II Tic-Cys-Gly	336,0	78,0 ± 1,9	0
III Sar-Cys-Gly	249,49	-	7,0 ± 14,0
IV Hyp-Cys-Gly	290,0	88,0 ± 1,5	0
V Ac-γ-Glu-Cys-Gly	349,36	-	10,1 ± 0,7
VI NMe-Glu-Cys-Gly	321,35	72,3 ± 3,5	0
VII Pro-Cys-Gly	275,32	-	10,4 ± 5,0
Ομάδα Β			
VIII γ-Glu-Met-Gly	335,38	70,7 ± 2,6	-
IX γ-Glu-Thi-Gly	357,38	67,4 ± 3,6	-
X γ-Glu-Cys(tButhio)-Gly	395,49	81,0 ± 1,2	-
XI γ-Glu-Cys(Acm)-Gly	378,4	59,4 ± 2,7	-
XII γ-Glu-NMeCys-Gly	321,35	100,0 ± 0,0	0
Ομάδα Γ			
XIII γ-Glu-Cys-Nva	349,4	85,2 ± 0,1	0
XIV γ-Glu-Cys-Nle	363,43	-	11,6 ± 5,4
XV γ-Glu-Cys-Sar	321,35	-	67,7 ± 1,2
XVI γ-Glu-Cys-Aib	335,38	-	15,8 ± 3,5

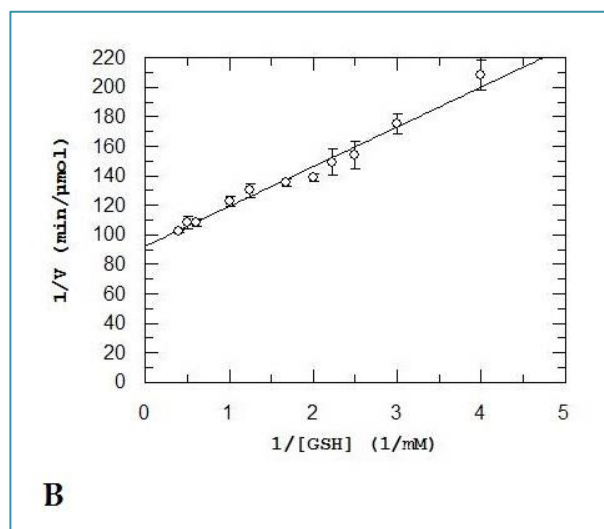
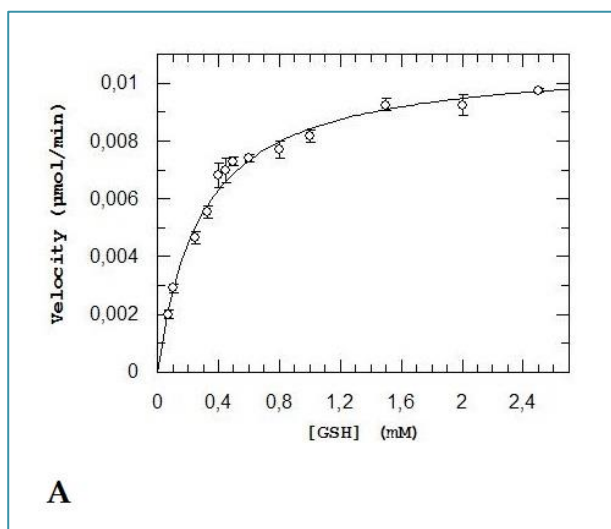
XVII γ-Glu-Cys-a-t-butyl-Gly	363,15	79,1 ± 3,7	0
Ομάδα Δ			
XVIII pGlu-Cys(Trt)-Gly	531,62	99,1 ± 2,3	-
XIX Sar-Cys(Trt)-Gly	491,60	92,2 ± 4,4	-
XX Tic-Cys-Ala	351,42	98,1 ± 2,6	0
XXI Hyp-Cys-Ala	305,35	76,6 ± 3,5	0
XXII Gly-Cys-Hyp	291,32	65,9 ± 3,1	0
XXIII Tic-Cys-Aib	365,45	84,2 ± 2,1	0
XXIV Tic-Cys(Acm)-Gly	408,47	68,6 ± 2,0	0
XXV Tic-Cys-Sar	351,42	74,6 ± 3,6	0

3.7. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων των επιλεγέντων πεπτιδικών αναλόγων και των ενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C ως προς GSH

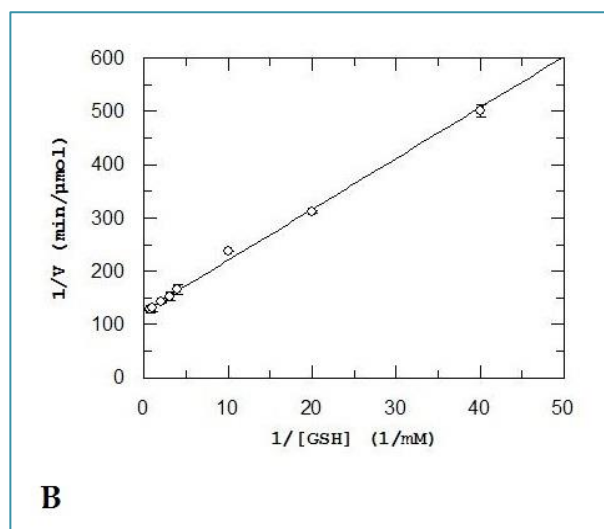
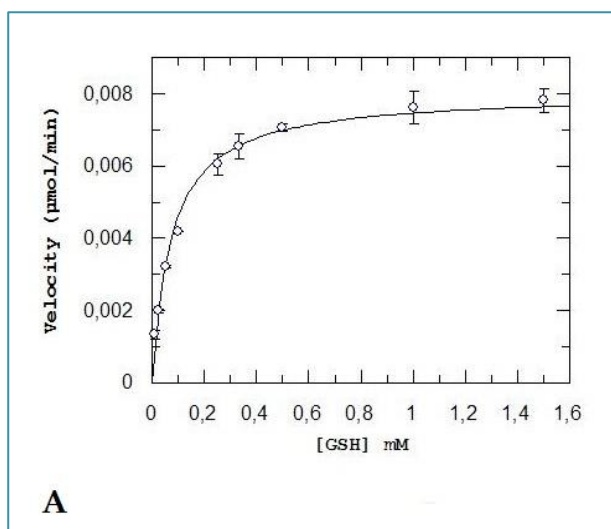
Η σάρωση των πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης για την ανίχνευση πιθανής ι-διότητας υποστρώματος οδήγησε στην επιλογή κάποιων εκ των πεπτιδίων αυτών για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων, αναλόγως του αλλοενζύμου στο οποίο έδωσαν αποτέλεσμα με κάποιο ενδιαφέρον. Βάσει των κινητικών υπολογισμού των σταθερών K_m για τα πεπτιδικά ανάλογα και για τη GSH των αλλοενζύμων, υπολογίστηκαν και οι κινητικές παράμετροι, δηλ. η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης V_{max} , η σταθερά καταλύσεως k_{cat} και η σταθερά εξειδικεύσεως (specificity constant) $k_A = k_{cat}/K_m$.

Πρώτα, όμως, πραγματοποιήθηκαν οι κινητικές υπολογισμού της σταθεράς K_m και των προαναφερθεισών κινητικών παραμέτρων σχετικά με το υπόστρωμα της GSH για τα τρία αλλοένζυμα που μας απασχολούν.

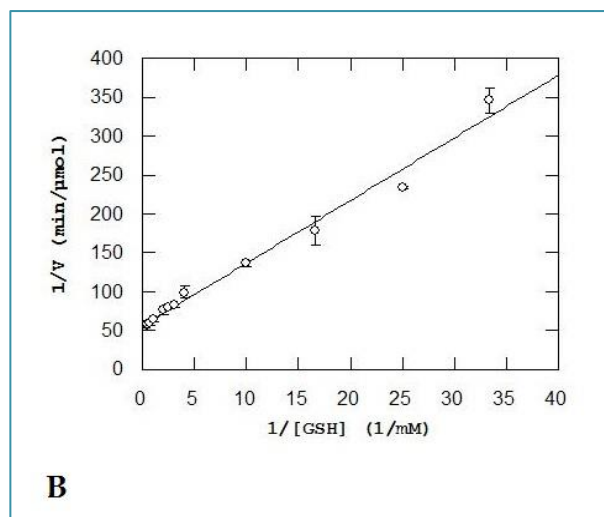
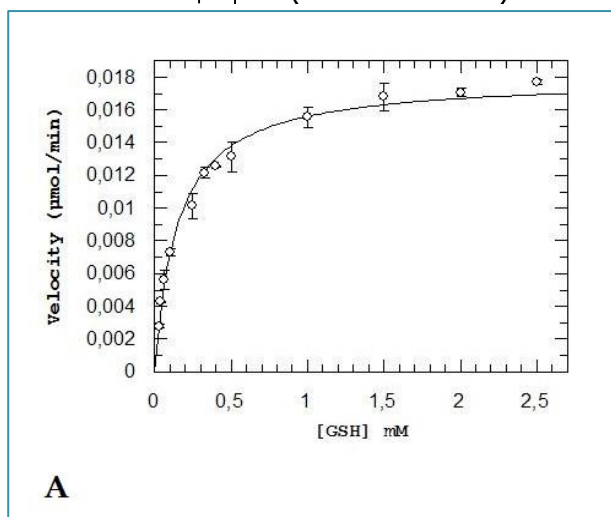
Οι επόμενες τρεις εικόνες (**Εικόνες 3.5, 3.6, 3.7**) παρουσιάζουν τα γραφήματα των κινητικών αναλύσεων για τον υπολογισμό της K_m και V_{max} για το κάθε αλλοένζυμο ξεχωριστά.



Εικόνα 3.5. Κινητική ανάλυση υπολογισμού K_m και V_{max} ως προς GSH για το ένζυμο hGSTP1*A, όπου (A) εμφανίζεται η καμπύλη Michaelis-Menten και (B) εμφανίζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk).



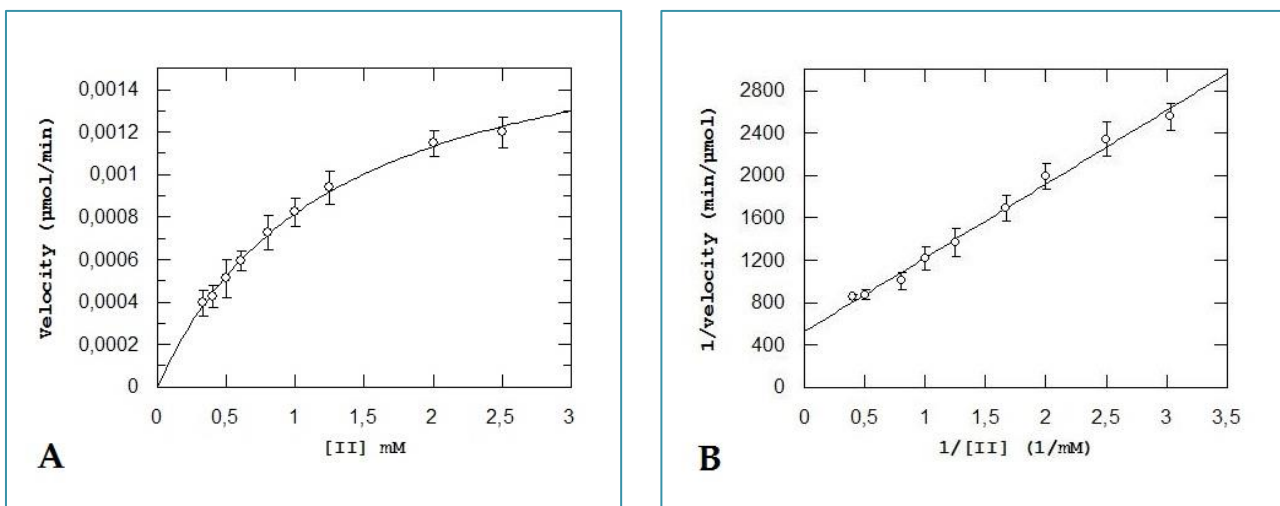
Εικόνα 3.6. Κινητική ανάλυση υπολογισμού K_m και V_{max} ως προς GSH για το ένζυμο hGSTP1*B, όπου (A) εμφανίζεται η καμπύλη Michaelis-Menten και (B) εμφανίζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk).



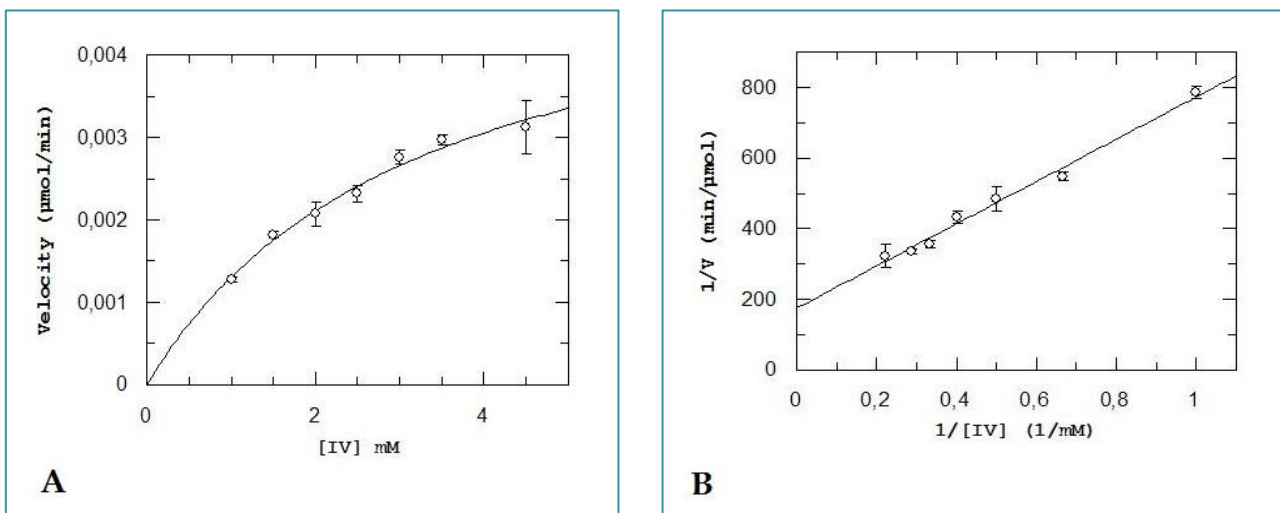
Εικόνα 3.7. Κινητική ανάλυση υπολογισμού K_m και V_{max} ως προς GSH για το ένζυμο hGSTP1*C, όπου (A) εμφανίζεται η καμπύλη Michaelis-Menten και (B) εμφανίζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk).

Οι εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνες 3.8-3.14**) παρουσιάζουν τα γραφήματα των κινητικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για τα επιλεγμένα πεπτιδικά ανάλογα.

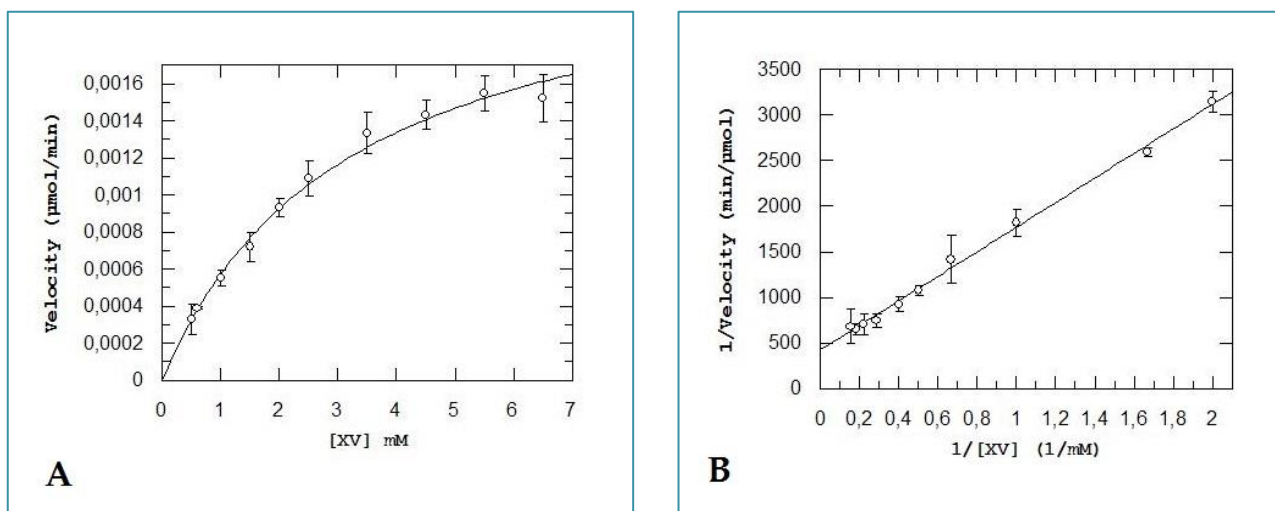
Κινητικές για το ένζυμο hGSTP1*A



Εικόνα 3.8. Κινητική ανάλυση υπολογισμού της K_m και V_{max} για το πεπτιδικό ανάλογο II, όπου (A) παρουσιάζεται η κινητική της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk)

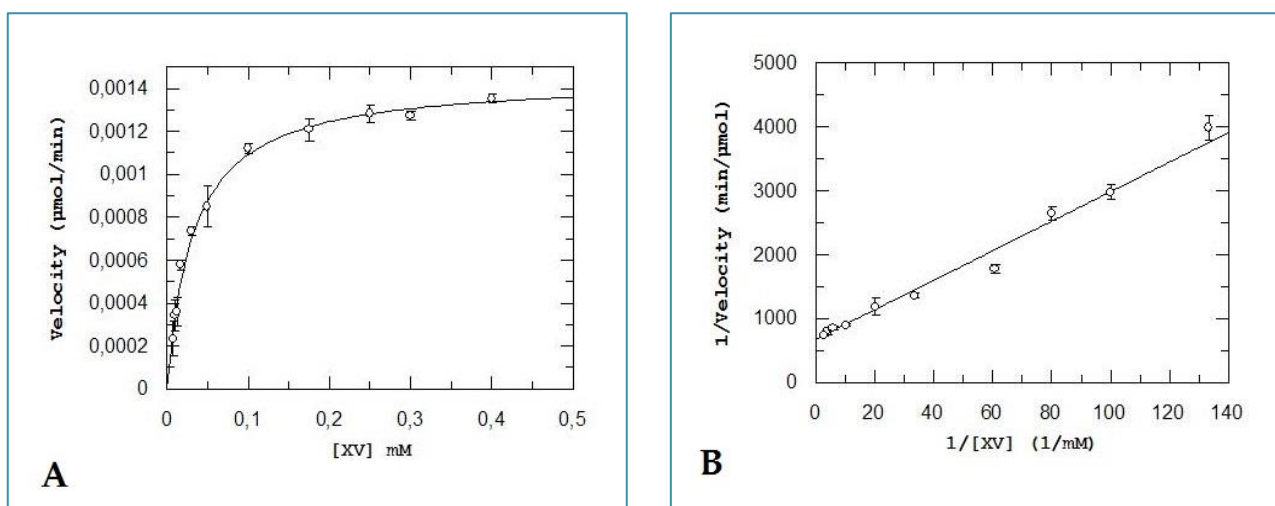


Εικόνα 3.9. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου IV όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk)



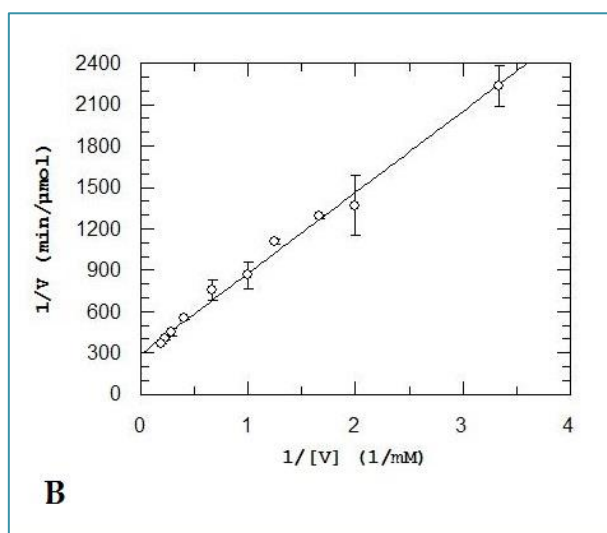
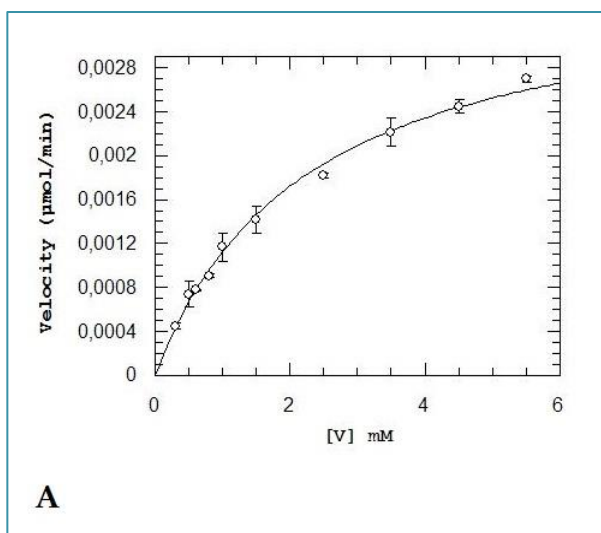
Εικόνα 3.10. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου XV όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστροφών (Lineweaver-Burk)

Κινητικές για το ένζυμο hGSTP1*B

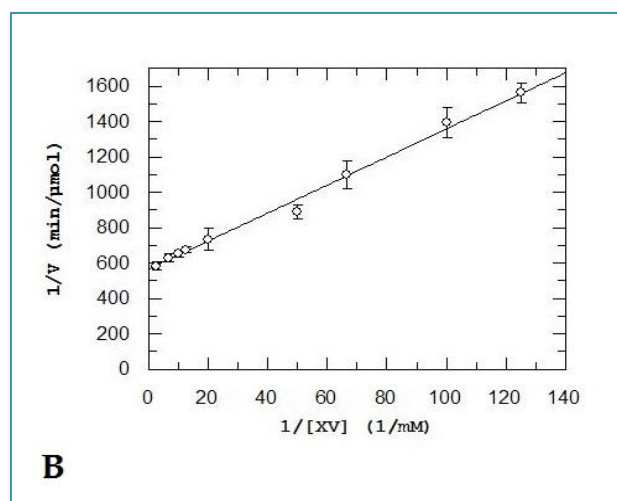
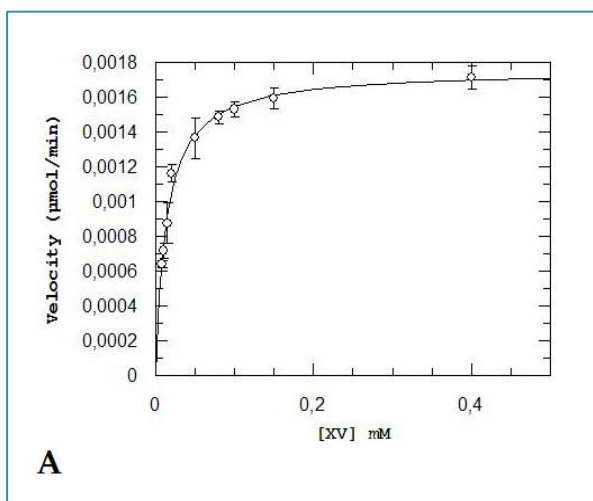


Εικόνα 3.11. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου XV όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστροφών (Lineweaver-Burk)

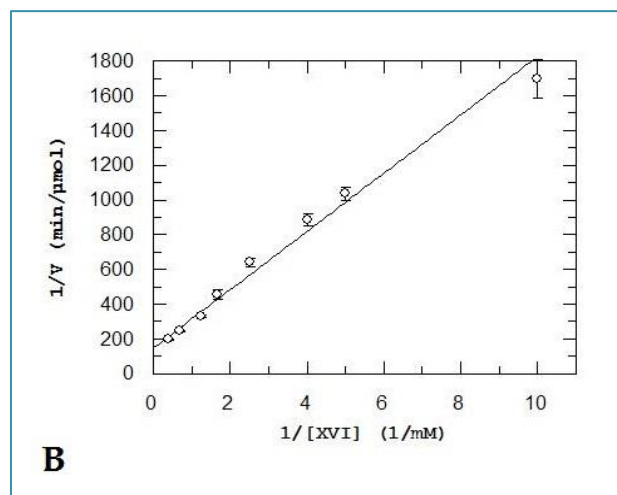
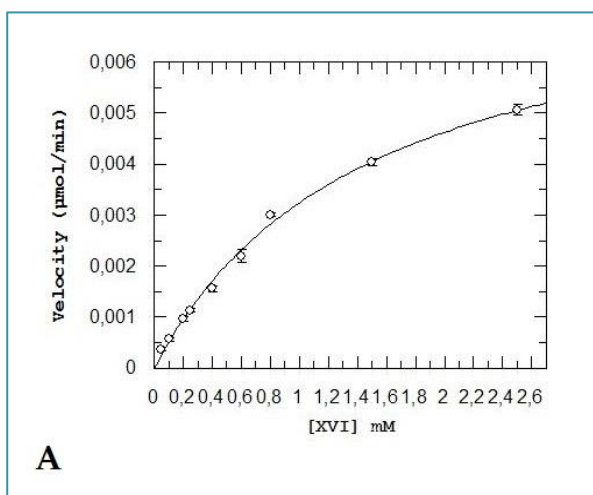
Κινητικές για το ένζυμο hGSTP1*C



Εικόνα 3.12. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου V όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk)



Εικόνα 3.13. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου XV όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk)



Εικόνα 3.14. Κινητική ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου XVI όπου (A) παρουσιάζεται η καμπύλη της εξίσωσης των Michaelis-Menten και (B) παρουσιάζεται η ευθεία των διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk)

Ο Πίνακας 3.6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών.

Πίνακας 3.6. Κινητικές παράμετροι των επιλεγμένων πεπτιδίων βάσει των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C.

Επεξήγηση των συμβόλων των πεπτιδικών αναλόγων:

GSH, γ -Glu-Cys-Gly

II, Tic-Cys-Gly

IV, Hyp-Cys-Gly

V, Ac- γ -Glu-Cys-Gly

XV, γ -Glu-Cys-Sar

XVI, γ -Glu-Cys-Aib.

Κινητική Παράμετρος	Πεπτιδικό Ανάλογο	hGSTP1*A	hGSTP1*B	hGSTP1*C
K_m (mM)	GSH	0,30 ± 0,02	0,074 ± 0,008	0,15 ± 0,01
	II	1,25 ± 0,07	-	-
	IV	3,22 ± 0,46	-	-
	V	-	-	2,24 ± 0,17
	XV	3,18 ± 0,28	0,033 ± 0,003	0,014 ± 0,001
	XVI	-	-	1,48 ± 0,19
k_{cat} (min ⁻¹)	GSH	101,87 ± 2,80	150,94 ± 5,66	137,41 ± 3,82
	II	18,56 ± 1,03	-	-
	IV	62,50 ± 4,55	-	-
	V	-	-	61,67 ± 1,66
	XV	23,30 ± 0,97	31,82 ± 0,00	33,33 ± 0,00
	XVI	-	-	114,29 ± 8,57
k_{cat}/K_m (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)	GSH	341,38 ± 39,25	2042,49 ± 333,84	906,37 ± 102,34
	II	14,80 ± 1,69	-	-
	IV	19,40 ± 4,86	-	-
	V	-	-	27,48 ± 3,09
	XV	7,33 ± 1,05	973,09 ± 84,05	2342,85 ± 281,56
	XVI	-	-	77,26 ± 17,95

3.8. Απεικόνιση της θέσης της γλουταθειόνης και της Η-θέσης του ενζύμου hGSTP1

Θέλοντας να ερευνήσουμε περαιτέρω τη θέση στην οποία πιθανόν να εμπλέκονται τα συνθετικά πεπτιδικά ανάλογα επιχειρήσαμε να παρουσιάσουμε -ει δυνατόν- την κατάσταση που ενδέχεται να επικρατεί στην Η-θέση του ενεργού κέντρου της hGSTP1. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε το αρχείο δεδομένων **8GSS** από τη βάση δεδομένων *PDB*, το οποίο περιλαμβάνει πληροφορίες από πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ, με το ένζυμο hGSTP1*A σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα της γλουταθειόνης.

Επεξεργαζόμενοι τα δεδομένα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα μοριακής προσομοίωσης *PyMOL*, προσπαθήσαμε να απεικονίσουμε βάσει των δεδομένων και των δυνατοτήτων του προγράμματος, τα οκτώ βασικά αμινοξέα της Η-θέσης που συμμετέχουν στην πρόσδεση της ηλεκτρονιόφιλης ένωσης (π.χ. CDNB), καθώς και τη θέση που λαμβάνει η γλουταθειόνη. Οι εν λόγω απεικονίσεις παρουσιάζονται στην **Παράγραφο 4.4** και βοηθούν στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων που λάβαμε από την αξιολόγηση των πεπτιδικών αναλόγων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ
ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ –
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Επεξηγηματική διάκριση πειραμάτων υποκλωνοποίησης και σάρωσης των 3πεπτιδίων

Οι σαρώσεις και κινητικές των πειραμάτων του **Κεφαλαίου 3** έχουν πραγματοποιηθεί με τα ετερόλογα εκφρασμένα αλλοένζυμα της hGSTP1, τα γονίδια των οποίων είχαν εισαχθεί στο φορέα pEXP5-CT/TOPO® (hGSTP1*A) και στον pOXO4 (hGSTP1*B και hGSTP1*C). Η ετερόλογη έκφραση είχε πραγματοποιηθεί σε κύτταρα εκφραστικά *E. coli* BL21(DE3), τα οποία και καθαρίστηκαν στη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας κατά τον τρόπο που περιγράφεται στην **παράγραφο §2.3.11**. Όμως, λόγω φαινομένων μείωσης της εκφραστικής ικανότητας των κυττάρων κατά τη χρήση των συγκεκριμένων πλασμιδιακών κατασκευών, μετά το πέρας των πειραματικών προσδιορισμών της παρούσας εργασίας, και θέλοντας να βελτιώσουμε την παραγωγή των ανασυνδυασμένων ενζύμων, επιχειρήθηκε και επετεύχθη η επανεισαγωγή όλων των γονιδίων στον φορέα pEXP5-CT/TOPO®.

Η επιλογή μόνο του πλασμιδιακού φορέα TOPO®, έγινε έτσι ώστε τα επόμενα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν να έχουν σαν κοινό παρονομαστή τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα.

4.2. Σχολιασμός των αποτελεσμάτων της υποκλωνοποίησης των γονιδίων της hGSTP1

Οι PCR που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποίησαν τους ίδιους εκλεκτικούς εκκινητές και για τις τρεις περιπτώσεις, καθώς οι διαφορές των αμινοξέων (hGSTP1*A → Ile104/Ala113, hGSTP1*B → Val104/Ala113, hGSTP1*C → Val104/Val113) βρίσκονται στο εσωτερικό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μακριά από τις θέσεις υβριδισμού τους. Επίσης, οι συγκεκριμένη θερμοκρασία υβριδισμού (53°C) επιλέχθηκε, καθώς οι T_m των εκκινητών κυμαίνονται στα συγκεκριμένα επίπεδα και φάνηκε ότι υβρίδισαν και έδωσαν ικανοποιητικό ποσό προϊόντος μήκους περίπου 650 bp (**Εικόνα 3.1**) για την πραγματοποίηση των κλωνοποιήσεων. Η επιλογή της KAPA HiFi πολυμεράσης για την πραγματοποίηση των PCR έγινε με γνώμονα την υψηλή αποδοτικότητα, την ευαισθησία, την ταχύτητα και την πολύ χαμηλή συχνότητα λάθους συγκρινόμενη με την Taq πολυμεράση, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα σφαλμάτων. Ωστόσο, το τελικό προϊόν της PCR δεν διαθέτει ουρά αδενινών, η οποία βοηθά στην ένωση των γονιδίων με τον πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος διαθέτει στα άκρα του ακολουθία από ελεύθερες θυμίνες (T). Αυτή την ικανότητα τη διαθέτει η Taq πολυμεράση, η οποία και χρησιμοποιήθηκε πριν την

πραγματοποίηση της κλωνοποίησης για την πολυαδενυλίωση των γονιδίων. Η βεβαίωση της εισαγωγής των γονιδίων στον φορέα ήλθε μετά από αλληλούχηση του πλασμιδίου που προέκυψε.

4.3. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των νέων αλλοενζύμων

Οι **Πίνακες 3.1** και **3.2** παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των καθαρισμών που πραγματοποιήθηκαν με τα αλλοένζυμα της hGSTP1 στις δύο περιπτώσεις πριν και μετά τις υποκλωνοποιήσεις. Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις εκφράσεων και καθαρισμών αξίζει να σημειωθεί ότι η εισαγωγή εκ νέου του γονιδίου του hGSTP1*A στον ίδιο φορέα (pEXP5-CT/TOPO®), προκάλεσε θεαματική αύξηση στα επίπεδα της ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου (από ~0,5 U/mL σε επίπεδα 300-400 U/mL). Η ειδική δραστηριότητα αυξήθηκε κατά 25 φορές περίπου την ίδια στιγμή που οι φορές καθαρισμού μειώθηκαν αισθητά, καθώς το ένζυμο παραγόταν σε μεγάλες ποσότητες και, συνεπώς, η συνεισφορά του στις ολικές πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος αυξήθηκε. Το ποσοστό της ανάκτησης του ενζύμου δεν μεταβλήθηκε, ωστόσο, είχε προηγηθεί σύνθεση του προσροφητή συγγένειας BES-GSH μεταξύ των δύο περιπτώσεων καθαρισμού, γεγονός που υποδεικνύει πως το ποσοστό της ανάκτησης του νέου ενζύμου είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό κρίνοντας από το βαθμό υπερέκφρασης.

Τα επίπεδα έκφρασης και καθαρισμού των άλλων δύο ενζύμων (hGSTP1*B και hGSTP1*C), έχοντας πραγματοποιήσει τις υποκλωνοποιήσεις, κυμάνθηκαν σχετικά σε χαμηλότερα επίπεδα συγκρινόμενα με τις αρχικές πλασμιδιακές κατασκευές (στον πλασμιδιακό φορέα pOXO4), σημειώνοντας ιδιαίτερη αύξηση στις φορές καθαρισμού του hGSTP1*B, αλλά μείωση στη hGSTP1*C. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις, το τελικό ενζυμικό προϊόν που προέκυπτε ήταν ιδιαίτερα καθαρό (**Εικόνα 3.4**).

Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας (SA) της μεταφοράς και των τριών αλλοενζύμων στον φορέα TOPO®, συμφωνούν με τα αποτελέσματα της **Πούλιου (2013)**, όσον αφορά τα αλλοένζυμα hGSTP1*B και hGSTP1*C, ενώ για το αλλοένζυμο hGSTP1*A, τα αποτελέσματα εν μέρει συμβαδίζουν με τις δημοσιεύσεις των **Peklak-Scott et al., 2008** (91 U/mg) και **Zimniac et al., 1994** (71,6 U/mg) επισημαίνοντας την ιδιαίτερα υψηλότερη τιμή της ειδικής δραστηριότητας σε σύγκριση με τις παλαιότερες περιπτώσεις (6,5 U/mg).

4.4. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των πεπτιδικών αναλόγων της GSH

Τα τριπεπτιδικά ανάλογα της γλουταθειόνης (GSH), που αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποτελούν υποστρώματα ή αναστολείς τριών αλλοενζύμων της τρανσφερά-

σης γλουταθειόνης ανθρώπου (hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C), σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν, ώστε να διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες. Ειδικότερα, βάσει της αλληλουχίας γ-Glu-Cys-Gly της γλουταθειόνης, τα 3πεπτιδικά ανάλογά της χωρίστηκαν στις ομάδες Α, Β, Γ και Δ. Στην ομάδα Α έχει αντικατασταθεί το αμινοξύ της θέσης 1 (γ-Glu), στην ομάδα Β έχει τροποποιηθεί το μεσαίο αμινοξύ της θέσης 2 (Cys), ενώ στην ομάδα Γ έχει αντικατασταθεί το ακραίο αμινοξύ της θέσης 3 (Gly). Τέλος, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των αξιολογήσεων των τριών πρώτων ομάδων, Α-Γ, συντέθηκαν τα 3πεπτιδικά ανάλογα της ομάδας Δ, τα οποία διαθέτουν συνδυαστικές αλλαγές σε περισσότερες από μία θέσεις.

4.4α. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των 3πεπτιδίων της ομάδας Α

Τα πεπτίδια της ομάδας Α συντέθηκαν με σκοπό την αύξηση της μεταβολικής σταθερότητας και βελτίωσης της βιολογικής τους δράσης, αλλά διατηρώντας την καταλυτική/προσδετική ικανότητά τους απέναντι στην hGSTP1. Επιπλέον, τα εν λόγω ανάλογα διατηρούν την κεντρική τους κυστεΐνη, ώστε μέσω αυτής, σε επόμενη μελέτη, να γεφυρωθούν χημικά με κατάλληλες οργανικές ενώσεις-αναστολείς του ισοενζύμου hGSTP1.

Λόγω της ύπαρξης της κυστεΐνης, η αξιολόγηση των πεπτιδίων ήταν διττή: αρχικά ως προς την ιδιότητα του υποστρώματος, και όσα πεπτίδια δεν ήταν υπόστρωμα, αξιολογήθηκαν ως προς την ιδιότητα του αναστολέα. Η αξιολόγηση των πεπτιδικών αναλόγων της ομάδας Α ως υποστρωμάτων (λόγω της κυστεΐνης που περιέχουν) αντί της GSH, έναντι των τριών αλλοενζύμων της hGSTP1, έδειξε ότι όλα τα πεπτίδια, εκτός του V, είναι υποστρώματα του αλλοενζύμου hGSTP1*A με πλέον ενδιαφέροντα τα II, IV και VII. Ωστόσο, με το αλλοένζυμο hGSTP1*C, ως υποστρώματα λειτούργησαν μόνο τα πεπτίδια II, V και VII, με τα δύο τελευταία να είναι τα καλύτερα. Είναι ενδιαφέρον ότι το πεπτίδιο V αποδείχθηκε υπόστρωμα μόνο με το αλλοένζυμο hGSTP1*C, ενώ κανένα πεπτίδιο της ομάδας Α δε λειτούργησε ως υπόστρωμα με το αλλοένζυμο hGSTP1*B.

Επιχειρώντας να αιτιολογήσουμε τα ανωτέρω αποτελέσματα ως προς την ιδιότητα του υποστρώματος, εν μέρει, μπορούμε να βασιστούμε στη δομή των αλλοενζύμων. Η θέση 104 της αμινοξικής ακολουθίας παρουσιάζει ενδιαφέρον. Ευρίσκεται εντός της αποκαλούμενης *H-περιοχής* δεσμεύσεως της ανθρώπινης GSTP1, δηλαδή, στην υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος (*Mannervik et al., 1978*). Στη συγκεκριμένη περιοχή, ούσα υπεύθυνη για την πρόσδεση των ξενοβιοτικών ενώσεων, έχουν καθοριστεί οκτώ αμινοξέα υπεύθυνα για τη λειτουργία αυτή, εκ των οποίων τα επτά είναι συντηρημένα και στα τρία αλλοένζυμα, έχοντας μόνο το κατάλοιπο της θέσης 104 να διαφέρει (*Widersten et al., 1992, Manoharan et al., 1992, Kong et al., 1992*). Ειδικότερα, στη θέση 104, το hGSTP1*A διαθέτει ισολευκίνη (Ile),

ενώ στην αντίστοιχη θέση τα αλλοένζυμα hGSTP1*B και hGSTP1*C διαθέτουν βαλίνη (Val) (*Ει-κόνες 4.1-4.9*) (Ali-Osman et al.,1997). Μελέτες *in silico* μοριακής προσομοίωσης, βασισμένες στην κρυσταλλοδομή της hGSTP1 (Ali-Osman et al.,1997), έδειξαν ότι, ως αποτέλεσμα αυτής της σημειακής μετάλλαξης, δημιουργούνται σημαντικές αποκλίσεις των διατομικών αποστάσεων αμινοξικών κατάλοιπων της ενεργού περιοχής, απέναντι από τη θέση που δεσμεύεται η γλουταθειόνη, στην είσοδο προς την Η-θέση που δεσμεύεται το ηλεκτρονιόφιλο (ξενοβιοτικό) υπόστρωμα, π.χ. CDNB. Σε αυτό το γεγονός πιθανότατα να οφείλεται και η διαφοροποίηση των τιμών της σταθεράς Michaelis, K_m , για τα τρία αλλοένζυμα, ως προς το υπόστρωμα CDNB, $K_m^A = 1,7 \text{ mM}$, $K_m^B = 2,0 \text{ mM}$ και $K_m^C = 3,2 \text{ mM}$ (Πούλιου, 2013). Είναι χαρακτηριστικό ότι στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση των τιμών K_m και ως προς το υπόστρωμα GSH και για τα τρία αλλοένζυμα ($K_m^A = 0,3 \text{ mM}$, $K_m^B = 0,074 \text{ mM}$ και $K_m^C = 0,15 \text{ mM}$). Βάσει αυτού, κρίνονται ως αναμενόμενες οι παρατηρηθείσες διαφοροποιήσεις στην ικανότητα τόσο του ίδιου πεπτιδικού αναλόγου, όσο και διαφορετικών αναλόγων, ως υποστρωμάτων των αλλοενζύμων. Στο πλαίσιο αυτό, είναι πολύ ενδιαφέρον ότι, βάσει των τιμών K_m , ο βαθμός εκλεκτικότητας των αλλοενζύμων για τη γλουταθειόνη ($B > C > A$) συνάδει με την ευκολία/χαλαρότητα πρόσδεσης, σε καταλυτική διαμόρφωση, των πεπτιδικών αναλόγων στα αλλοένζυμα (μη υποστρώματα για το πλέον εκλεκτικό αλλοένζυμο hGSTP1*B, μέτρια υποστρώματα για το hGSTP1*C, και καλύτερα υποστρώματα για το λιγότερο εκλεκτικό hGSTP1*A). Λεπτομερέστερη επεξήγηση των επιμέρους ικανοτήτων των πεπτιδικών αναλόγων να λειτουργούν ως υποστρώματα, θα απαιτήσει επιπλέον *in silico* μελέτη των αντιστοιχών συμπλόκων με τα αλλοένζυμα, σε συνδυασμό με κρυσταλλογραφική μελέτη των αντιστοιχών συμπλόκων.

4.4β. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των 3πεπτιδίων της ομάδας B

Τα πεπτιδικά ανάλογα της ομάδας B, παρουσιάζουν αντικατεστημένο το μεσαίο αμινοξύ (κυστεΐνη) με μη πολικά αμινοξέα, τα οποία περιέχουν S προστατευμένο ώστε να μην είναι διαθέσιμο για μοριακές αλληλεπιδράσεις. Σκοπός των αναλόγων αυτών, είναι αφενός η απόδειξη της σημασίας του ελεύθερου θείου για την επιτυχή καταλυτική αλληλεπίδραση με τις GSTs, και αφετέρου, η πιθανή ανακάλυψη αναστολέων κατά των υπό μελέτη αλλοενζύμων.

Επειδή η G-περιοχή των GSTs, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της γλουταθειόνης, είναι γενικώς συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων τάξεων (Mannervik et al., 1978), το ενδεχόμενο επιτυχούς πρόσδεσης των αναλόγων της ομάδας B αποκλείεται. Επομένως, η ομάδα αυτή εξετάζεται μόνο ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τα αλλοένζυμα της hGSTP1.

Η ενζυμική αναστολή κυμαίνεται από 0 έως 40,6 %, ωστόσο αξίζει να σημειωθούν κάποια ευρήματα από τα τρία «σύνολα» σαρώσεων. Το ανάλογο IX εμφάνισε το ίδιο ποσοστό αναστο-

λής στα αλλοένζυμα hGSTP1*A και hGSTP1*C, με σημαντικά μικρότερη αναστολή για το hGSTP1*B. Αυτό συνάδει με την παρατηρηθείσα υψηλότερη εκλεκτικότητα του hGSTP1*B για τη γλουταθειόνη, συγκριτικά με τα άλλα δύο αλλοένζυμα. Ίσως κάποια χρησιμότητα να διαφαίνεται, καθώς έναντι των τριών αλλοενζύμων -σε καρκινικά κύτταρα- η hGSTP1*B, βρίσκεται σε σημαντικά χαμηλότερη αναλογία έκφρασης σε σχέση με τα δύο άλλα αλλοένζυμα (*Ali-Osman et al., 1997*). Επίσης, το πεπτίδιο XI εμφανίζει σχετικά την ίδια αναστολή με αλλοένζυμα hGSTP1*B και hGSTP1*C, ενώ σημαντικά μικρότερη αναστολή εμφανίζεται με το hGSTP1*A. Αυτή η ένδειξη δείχνει πιθανόν μια προτίμηση προς τα δύο αλλοένζυμα που διαθέτουν βαλίνη στη θέση 104 (*Εικόνες 4.3-4.6*), καθώς επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που τα κωδικοποιούν είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση συγκεκριμένων όγκων, π.χ. στους πνεύμονες, την ουροδόχο κύστη και τους όρχεις (*Harries et al., 1997 και Ryberg et al., 1997*). Τέλος, το ανάλογο XII, το οποίο πρόκειται για γλουταθειόνη με μεθυλιωμένη την αμινομάδα της Cys, εντυπωσιάζει με την παντελή απουσία αναστολής των αλλοενζύμων, η οποία ενδεχομένως να σχετίζεται με κάποια στερεοχημική παρεμπόδιση που αποτρέπει την οποιαδήποτε συμπλοκοποίηση με τα αλλοένζυμα.

4.4γ. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των 3πεπτιδίων της ομάδας Γ

Τα πεπτιδικά ανάλογα της ομάδας C διαθέτουν μεταβολές στο τρίτο αμινοξύ (Gly), όπου σκοπός τους είναι η βελτίωση της σταθερότητάς τους έναντι πρωτεόλυσης, καθώς και η βελτίωση της απορρόφησής τους από τις μεμβράνες. Λόγω της ύπαρξης της κυστεΐνης, η αξιολόγηση των πεπτιδίων ήταν διττή: αρχικά ως προς την ιδιότητα του υποστρώματος, και όσα πεπτίδια δεν ήταν υπόστρωμα, αξιολογήθηκαν ως προς την ιδιότητα του αναστολέα.

Στα αποτελέσματα της αξιολόγησης των αναλόγων για την πιθανή ιδιότητα του υποστρώματος, ξεχωριστή θέση κατέχει το XV, καθώς έδωσε την καλύτερη σχετική δραστικότητα από όλα όσα ελέγχθηκαν, ιδίως στα αλλοένζυμα hGSTP1*B και hGSTP1*C. Το συγκεκριμένο ανάλογο έδωσε πολύ μικρότερη τιμή δραστικότητας και με το hGSTP1*A. Η εισαγωγή της σαρκosίνης (Sar) στη θέση της γλυκίνης (Gly) αυξάνει την λιποφιλικότητα του αναλόγου, άρα το κάνει πιο υδρόφοβο και πιο πιθανό να προσδεθεί. Και εδώ, πιθανότατα η παρουσία της βαλίνης στη θέση 104 να παίζει σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα για τη δέσμευση αυτή, καθώς υπάρχει στα δύο αυτά αλλοένζυμα που έδωσε υψηλή σχετική δραστικότητα. Δεύτερο, αλλά όχι εξίσου καλό σαν υπόστρωμα, αποδείχθηκε το ανάλογο XIV, το οποίο και έδωσε δραστικότητα για τη hGSTP1*A και λιγότερο για τη hGSTP1*C, ενώ καθόλου με τη hGSTP1*B. Η νορλευκίνη (Nle) που υπάρχει στο συγκεκριμένο ανάλογο, σαν μη φυσικό αμινοξύ, αυξάνει τη λιποφιλικότητα και, ενδεχομένως, εισάγει περιορισμούς στη δέσμευση. Έχοντας μειώσει την «ευλυγισία» που μπορεί να προσφέρει το αμινοξύ της γλυκίνης με την αντικατάστασή του, έχουμε δημιουρ-

γήσει ένα σταθερότερο ανάλογο της γλουταθειόνης, το οποίο και αναγνωρίζεται περίπου το ίδιο σε δραστικότητα με το φυσικό υπόστρωμα της hGSTP1*A. Τέλος, αξίζει να επισημανθεί ότι το ανάλογο XVI, εμφανίζει υποτυπώδη δραστικότητα μόνο για τη hGSTP1*C, ενώ δεν εμφανίζει για τα δύο άλλα αλλοένζυμα, πράγμα το οποίο σημαίνει πως το α-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ (Aib) δεν επηρεάζει στο ίδιο βαθμό προκαλώντας στερεοχημική παρεμπόδιση, όπως τα άλλα δύο, με αποτέλεσμα να καταφέρει και να προσδένεται σε μικρό ποσοστό.

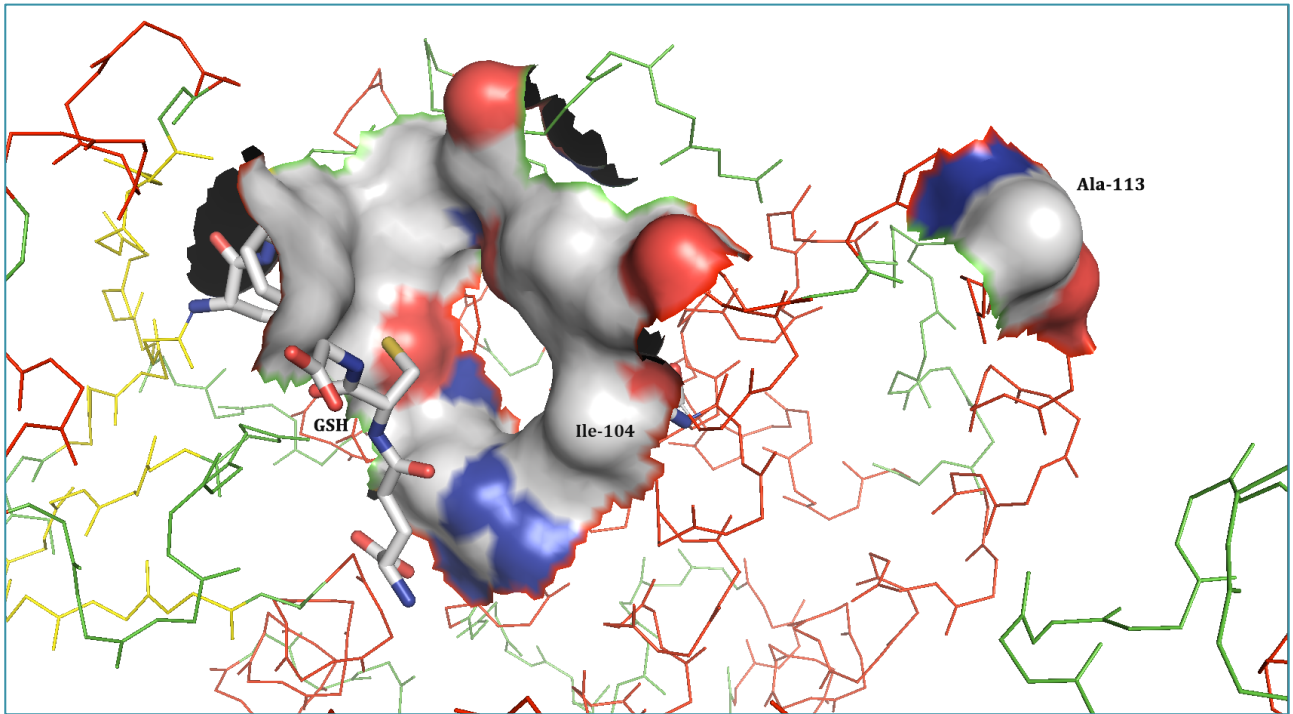
Η σάρωση των πεπτιδίων της ομάδας Γ για πιθανή εύρεση **αναστολέα**, δεν είχε κάποια αξιολογα αποτελέσματα, δεδομένου του γεγονότος ότι η μέγιστη ενζυμική αναστολή δεν υπερβαίνει το 21 %. Συνεπώς, η παρέμβαση στο τρίτο αμινοξύ της γλουταθειόνης δεν φαίνεται να έπαιξε σημαντικό ρόλο στη δέσμευση και την πρόκληση παρεμπόδισης της λειτουργίας των αλλοενζύμων.

4.4δ. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης των 3πεπτιδίων της ομάδας Δ

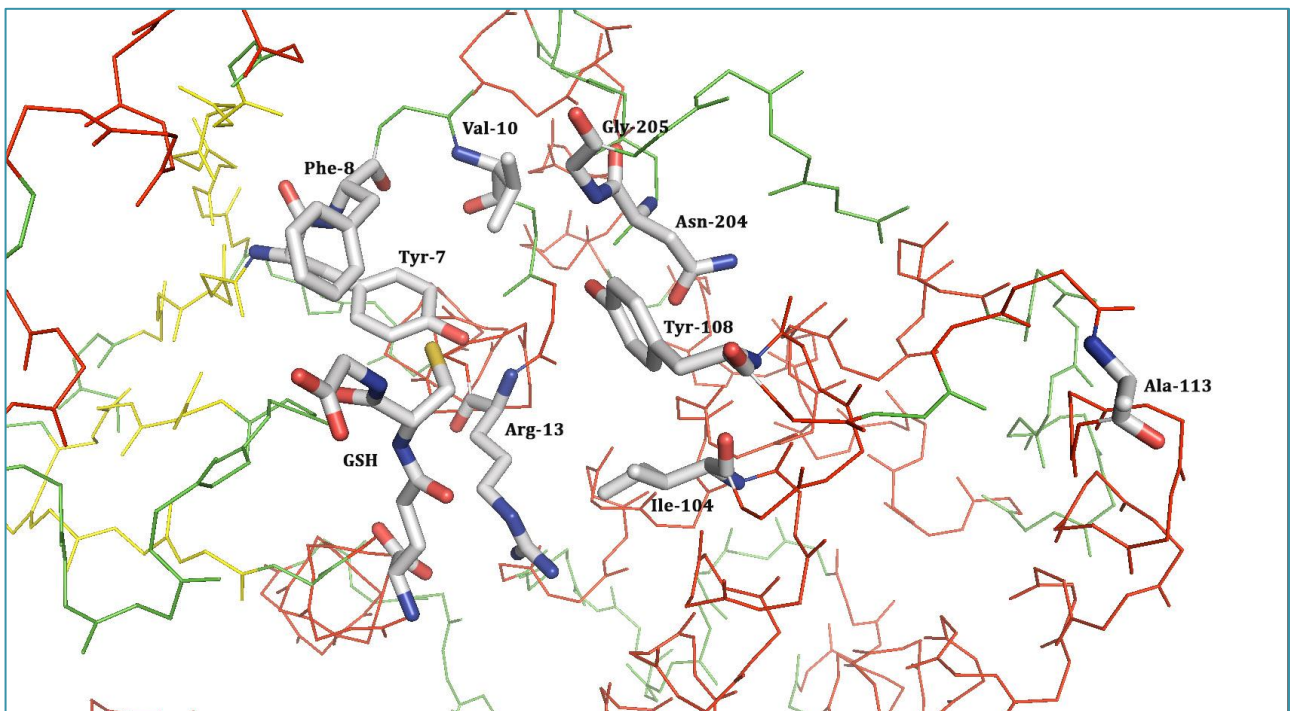
Τα πεπτιδικά ανάλογα της συγκεκριμένης ομάδας προέκυψαν από συνδυαστικές αλλαγές σε περισσότερες της μιας θέσης στο φυσικό υπόστρωμα, γλουταθειόνη.

Η σάρωση των περισσότερων ως πιθανών **υποστρωμάτων** δεν έδειξε δραστικότητας με κάποιο από τα αλλοένζυμα. Ο συνδυασμός των διπλών αλλαγών αφαίρεσε κατά πάσα πιθανότητα την ενδεχόμενη ομοιότητα με το φυσικό υπόστρωμα, τη γλουταθειόνη, οπότε και το ενδεχόμενο αναγνώρισης κάποιου από αυτά ως υποψήφιο υπόστρωμα, παρόλο που η ενδιάμεση κυστεΐνη των μορίων είχε διατηρηθεί. Προφανώς η στερεοδομικές μεταβολές στα πεπτιδικά ανάλογα ήταν πολύ δραστικές ώστε να γίνουν «αποδεκτές» από το ένζυμο-στόχο.

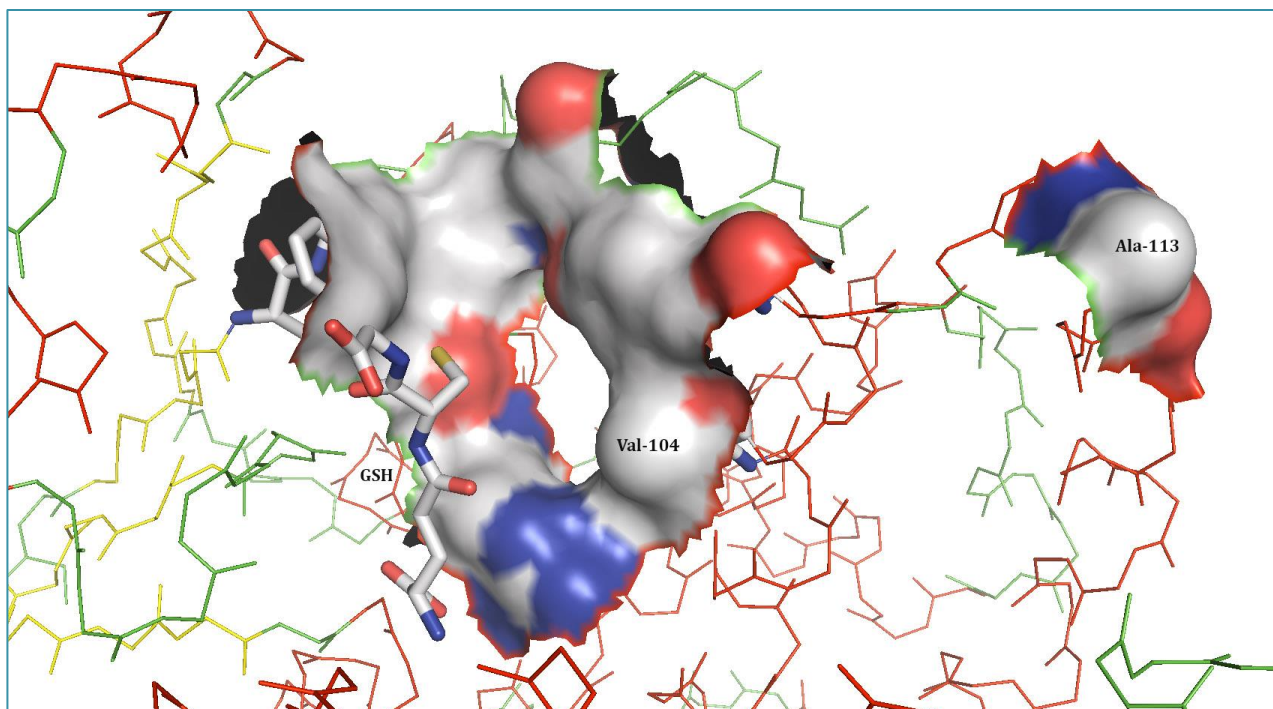
Αντίθετα, η σάρωση των αναλόγων με την ιδιότητα του **αναστολέα**, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, με προεξάρχον το πεπτίδιο XXV, το οποίο φαίνεται να αποτελεί μια ιδιάζουσα περίπτωση, καθώς αποτελεί τον συνδυασμό των δύο καλύτερων αναλόγων που εξετάστηκαν για την ιδιότητα του υποστρώματος των II και XV. Ο συνδυασμός αυτός, έδειξε ότι εκμηδενίζει την ικανότητα για κάποια σημαντικότερη ή τουλάχιστον ενδιάμεση, συγκριτικά, ενζυμική δραστικότητα ως προς τα τρία αλλοένζυμα, αλλά ενίσχυσε την ικανότητα αναστολής των αλλοενζύμων hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C, και ιδίως του πρώτου. Το αμινοξύ Tic ενίσχυσε τη σταθερότητα του πεπτιδίου, ενώ η Sar βελτίωσε την υδροφοβικότητά του. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την επιτυχεστέρα πρόσδεσή του στα αλλοένζυμα, οπότε και βελτίωσε την ισχύ της αναστολής. Η εξαφάνιση της πιθανότητας να είναι υπόστρωμα, ίσως να οφείλεται και στο γεγονός της στερεοχημικής παρεμπόδισης, ώστε να μην καθίσταται εύκολη η εμπλοκή της κυστεΐνης στην αναγνώριση του πεπτιδίου σαν υπόστρωμα. Οι ακόλουθες εικόνες απεικονίζουν τις δομές από το αρχείο PDB **8GSS** που βασιστήκαμε για την προσεγγιστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.



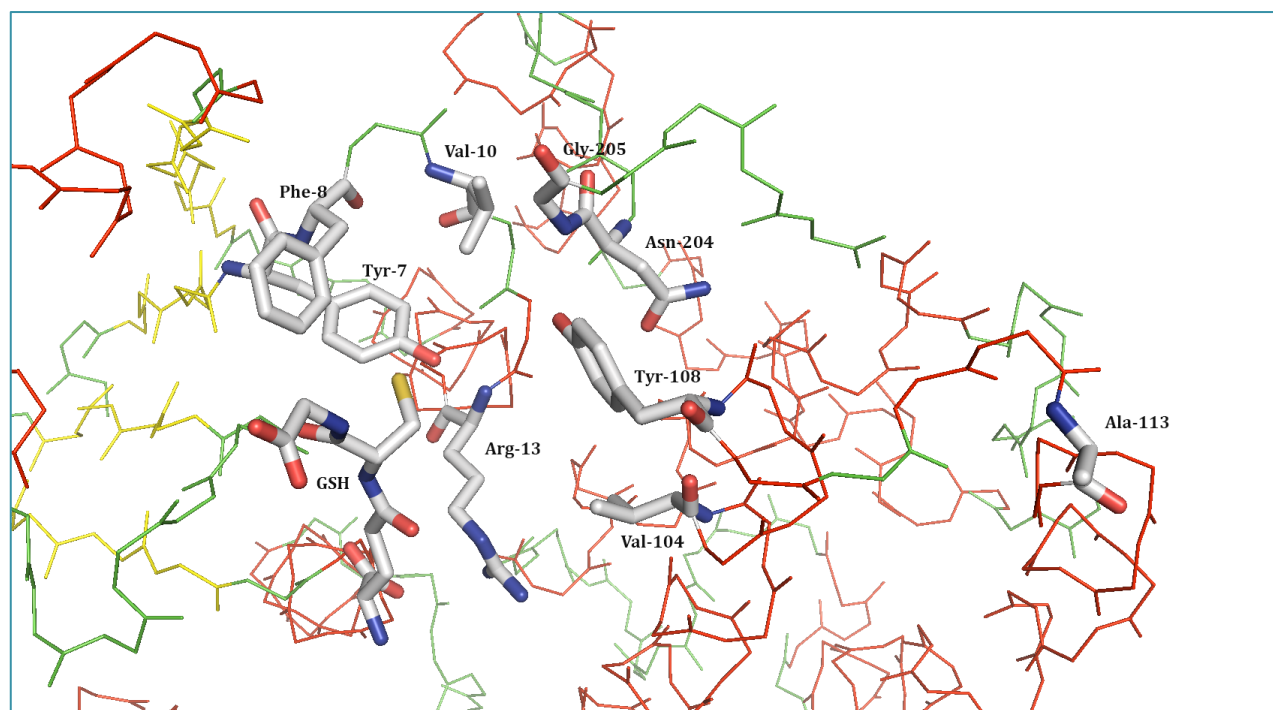
Εικόνα 4.1. Παρουσίαση των καταλυτικών αμινοξέων της Η-θέσης του hGSTP1*A, όπου επισημαίνονται τα δύο αμινοξέα, που διαφέρουν μεταξύ των αλλοενζύμων, καθώς και της θέσης πρόσδεσης της γλουταθειόνης. Η εικόνα αυτή προέρχεται από το αρχείο 8GSS της βάσης δεδομένων PDB, μετά από επεξεργασία στο πρόγραμμα PyMOL.



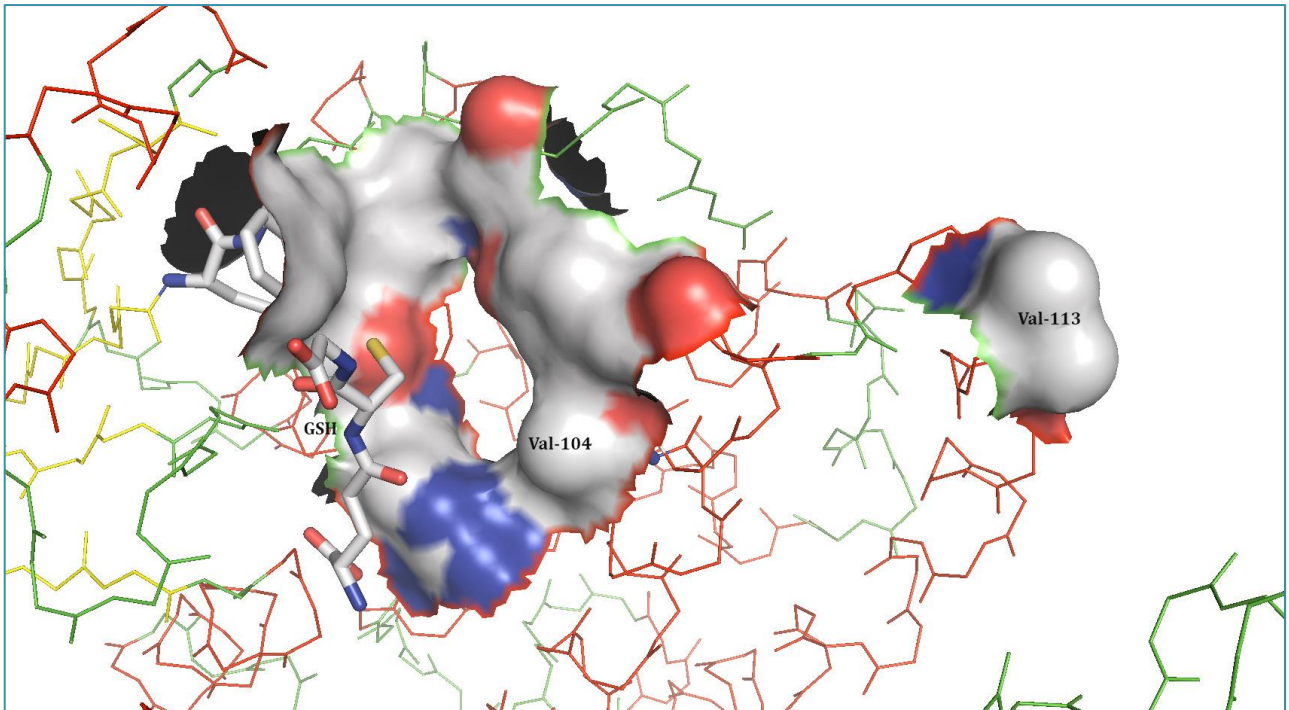
Εικόνα 4.2. Τα οκτώ βασικά αμινοξέα της Η-θέσης που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος, μαζί με την γλουταθειόνη και το αμινοξύ της Αλανίνης (Ala-113), το οποίο ευρίσκεται εκτός της περιοχής αυτής. Ένζυμο hGSTP1*A, εικόνα από το πρόγραμμα PyMOL.



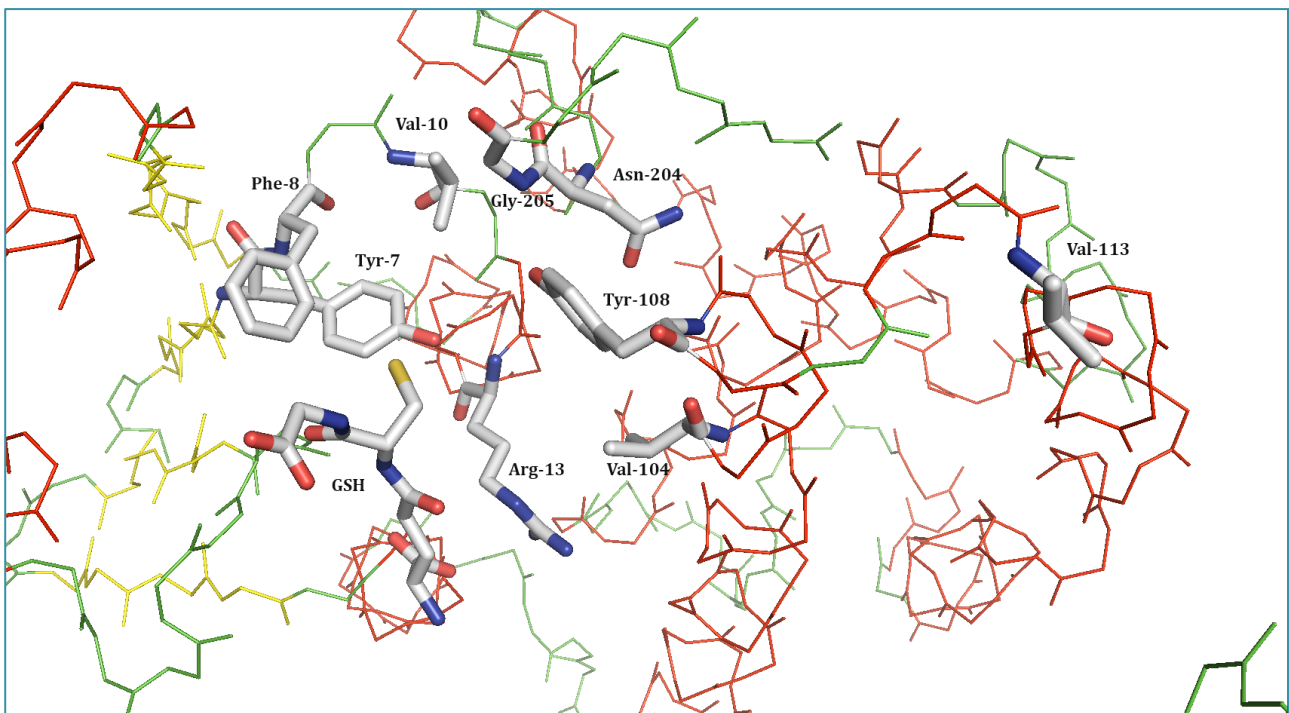
Εικόνα 4.3. Παρουσίαση υπό μορφή επιφάνειας της Η-θέσης πρόσδεσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος για το αλλοένζυμο hGSTP1*B. Διακρίνεται η θέση της γλουταθειόνης και οι δύο βασικές αμινοξικές διαφορές των αλλοενζύμων (Val-104, Ala-113). Εικόνα από το πρόγραμμα PyMOL.



Εικόνα 4.4. Τα βασικά καταλυτικά αμινοξέα της Η-θέσης του αλλοενζύμου hGSTP1*B παρουσία του φυσικού υποστρώματος της γλουταθειόνης. Η Ala-113, τοποθετείται εκτός της περιοχής αυτής. Εικόνα από το πρόγραμμα PyMOL.

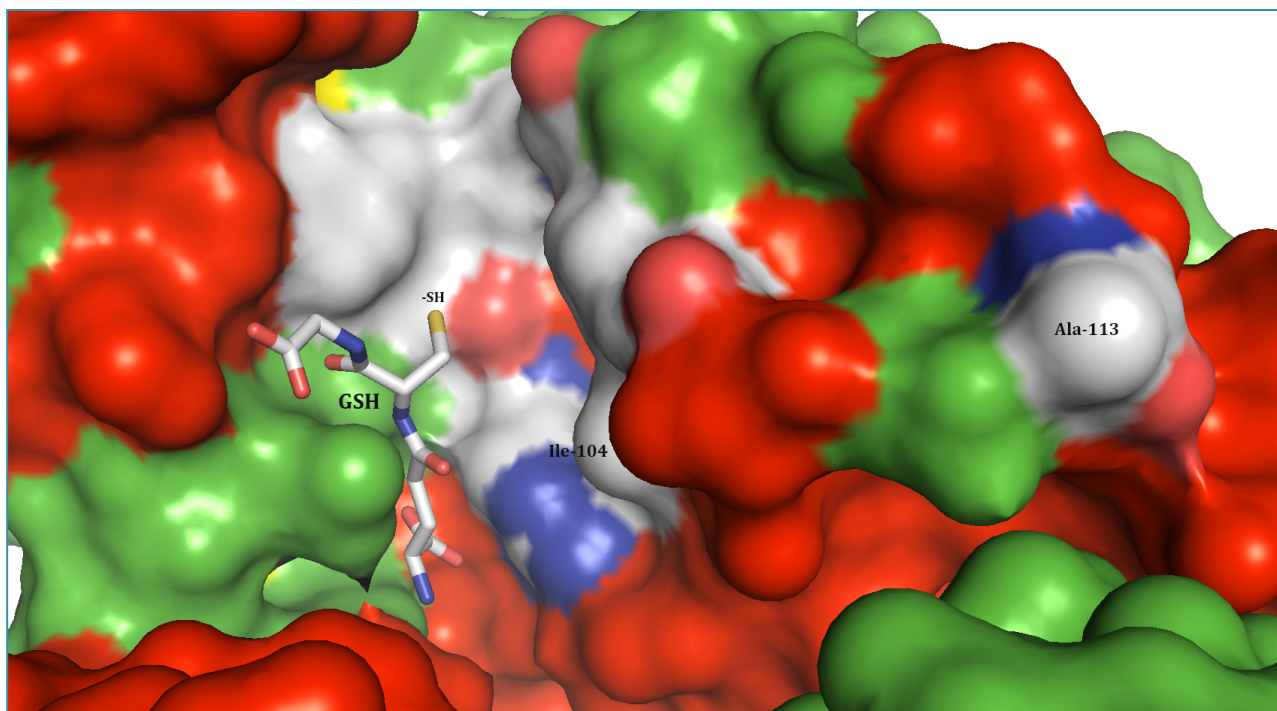


Εικόνα 4.5. Απεικόνιση υπό μορφή επιφάνειας της Η-θέσης πρόσδεσης ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος της hGSTP1*C. Διακρίνεται η γλουταθειόνη και τα δύο βασικά αμινοξέα (Val-104 και Val-113) που διαφέρουν μεταξύ των αλλοενζύμων της hGSTP1. Εικόνα από το PyMOL.

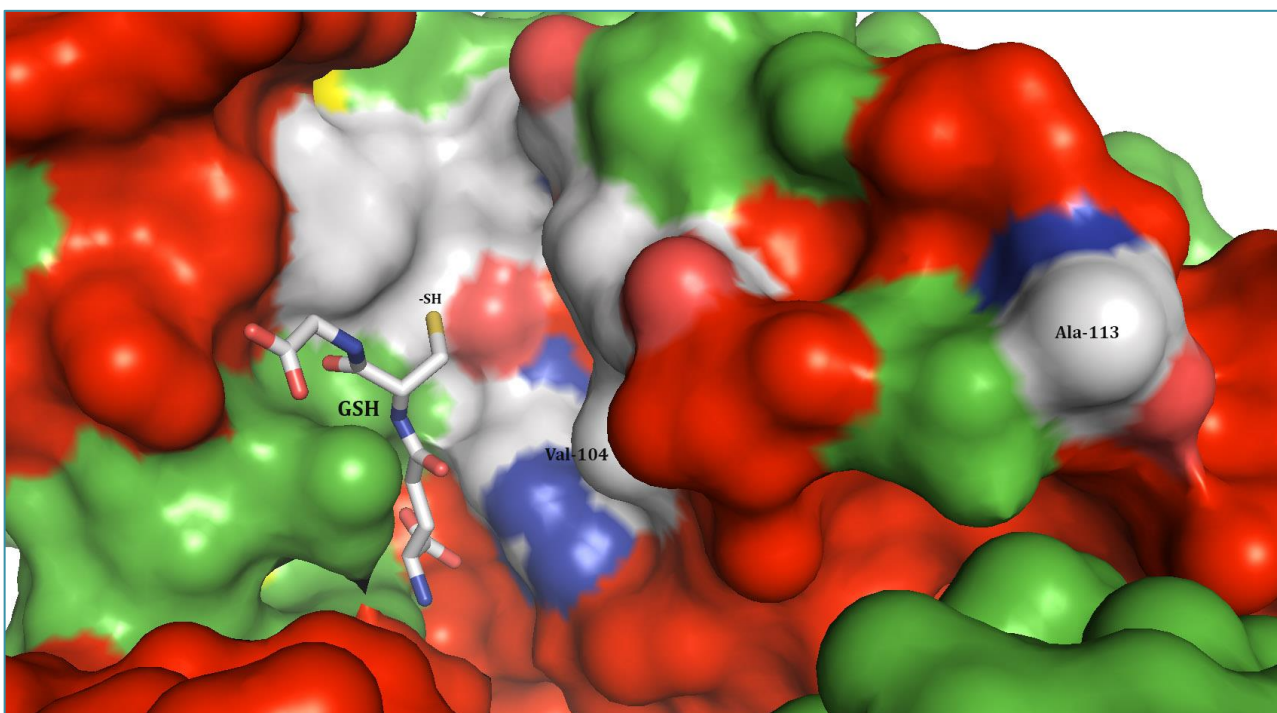


Εικόνα 4.6. Αναφορά των βασικών καταλυτικών αμινοξέων της Η-θέσης του αλλοενζύμου hGSTP1*C, μαζί με τη γλουταθειόνη και τη θέση 113 (Val-113) που τοποθετείται εκτός της περιοχής αυτής. Εικόνα από το πρόγραμμα PyMOL.

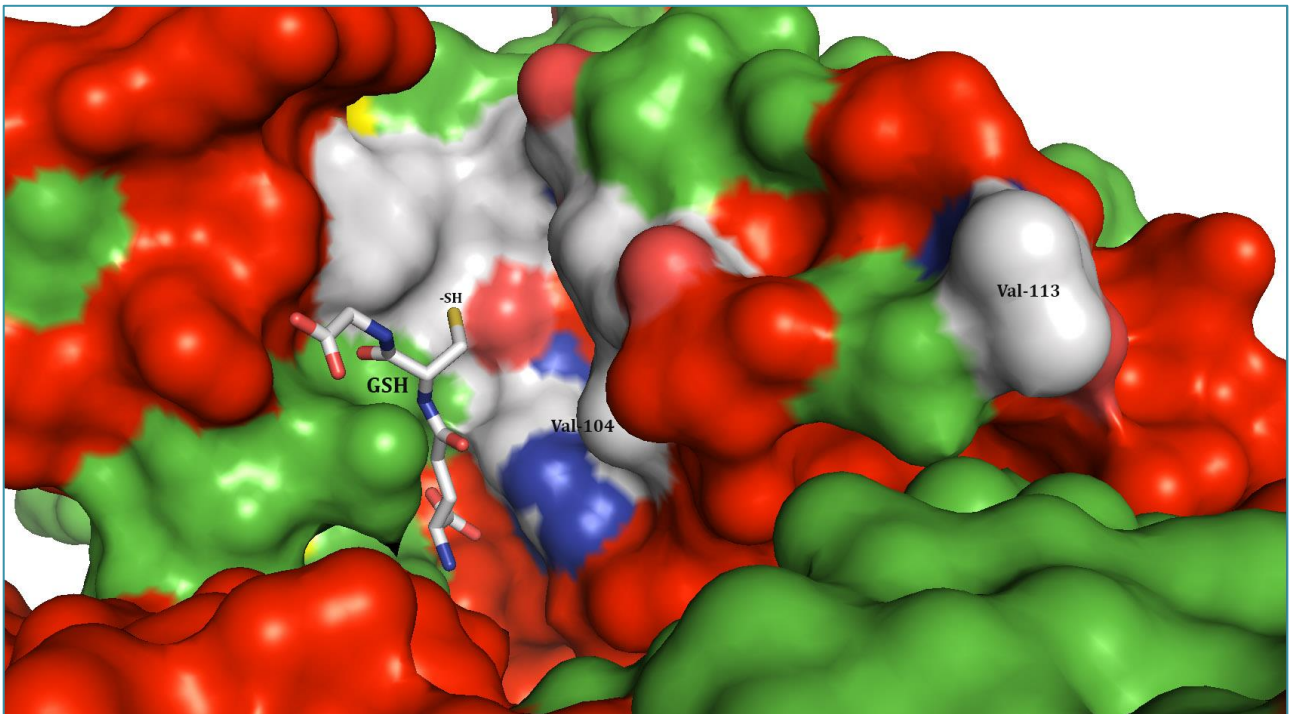
Οι επόμενες τρεις εικόνες (*Εικόνες 4.7, 4.8 και 4.9*) που ακολουθούν παρουσιάζουν την αντίστοιχη θέση στο σύνολο του μορίου της hGSTP1, έχοντάς το σε μορφή επιφάνειας από το πρόγραμμα PyMOL.



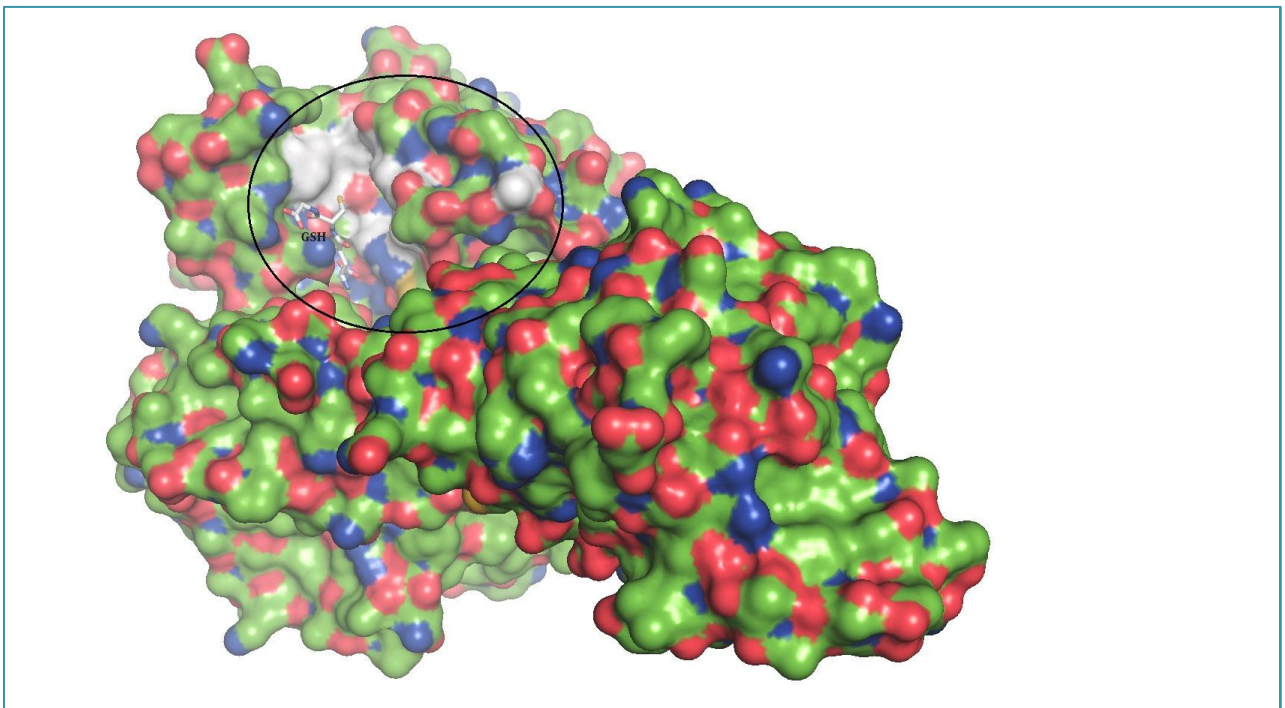
Εικόνα 4.7. Απεικόνιση της Η-θέσης του αλλοενζύμου hGSTP1*A μαζί με τη γλουταθειόνη έχοντας το ένζυμο υπό μορφή επιφάνειας. Τα αμινοξέα που επισημαίνονται με το γκρίζο χρώμα είναι τα καταλυτικά της συγκεκριμένης καταλυτικής περιοχής, εκτός της Ala-113. Εικόνα PyMOL.



Εικόνα 4.8. Εικόνα όμοια με την 3.21, που απεικονίζει το αλλοένζυμο hGSTP1*B. Στο πρόγραμμα της μοντελοποίησης η αντικατάσταση της Ile-104 από τη Val-104, δεν έδειχνε να υπάρχουν αλλαγές στην επιφάνεια του ενζύμου.



Εικόνα 4.9. Παρουσίαση της Η-θέσης του αλλοενζύμου hGSTP1*C, μαζί με τη γλουταθειόνη και την εμφανή διαφορά που προκύπτει στο σύνολο της απεικόνισης υπό μορφή επιφάνειας όταν υπάρχει αλλαγή στο αμινοξύ της θέσης 113.



Εικόνα 4.10. Απεικόνιση του συνόλου του ενζυμικού μορίου που χρησιμοποιήθηκε και περιγράφεται στο αρχείο 8GSS της βάσης δεδομένων PDB. Η περιοχή σε κύκλο υποδεικνύει την Η-θέση και το μόριο της γλουταθειόνης που περιγράφονται στις ανωτέρω εικόνες.

4.5. Σχολιασμός του πίνακα των κινητικών παραμέτρων των επιλεγμένων πεπτιδικών αναλόγων

Βάσει των αποτελεσμάτων που παραλάβαμε από την αξιολόγηση των πεπτιδικών αναλόγων για τα τρία αλλοένζυμα hGSTP1*A, hGSTP1*B και hGSTP1*C επιλέξαμε κάποια από αυτά, τα οποία προφανώς είχαν αξιολογηθεί σαν υποστρώματα, για τον υπολογισμό των κινητικών χαρακτηριστικών τους έναντι του αλλοενζύμου στο οποίο και ανταποκρίθηκαν λιγότερο ή περισσότερο. Από αυτά, επιλέξαμε τα II και IV για τη hGSTP1*A, τα V και XVI για τη hGSTP1*C και το ανάλογο XV και για τα τρία αλλοένζυμα. Τα δύο πρώτα επελέγησαν, καθώς έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα από τα ανάλογα και μόνο για το hGSTP1*A, ενώ τα δύο επόμενα, έδωσαν μια στοιχειώδη σχετική δραστηριότητα μόνο για το hGSTP1*C.

Κινητικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis K_m των αλλοενζύμων για τα πεπτίδια και για το φυσικό τους υπόστρωμα (GSH), έδειξαν, όπως ήταν αναμενόμενο, υψηλότερες τιμές για τα ανάλογα σε σύγκριση με τις προσδιορισθείσες τιμές K_m για τη GSH. Μόνη εξαίρεση το πεπτιδικό ανάλογο XV, το οποίο και έδωσε τιμές μικρότερες των K_m για τη GSH, γεγονός που με πρώτη ματιά υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο ανάλογο έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τα hGSTP1*B και hGSTP1*C ξεπερνώντας το φυσικό υπόστρωμα, τη γλουταθειόνη.

Στη συνέχεια, περνάμε στον υπολογισμό της σταθεράς καταλύσεως k_{cat} , η οποία εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που καταλύονται στη μονάδα του χρόνου (συνήθως ο χρόνος σε δευτερόλεπτα στην παρούσα εργασία σε λεπτά) από ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε μια ενεργό περιοχή, δηλ. η k_{cat} ισούται με τον αριθμό μετατροπής ή ανακυκλίσεως του ενζύμου. Συνεπώς, μια υψηλότερη τιμή της k_{cat} σημαίνει ότι το ένζυμο δρα ταχύτερα για ένα υπόστρωμα σε σύγκριση με ένα άλλο. Έτσι, για τον Πίνακα 3.6 ταχύτερο ένζυμο καθίσταται το hGSTP1*C για το ανάλογο XVI, παρόλο που η τιμή της K_m είναι περίπου κατά δέκα φορές μεγαλύτερη της GSH και η σχετική δραστηριότητα υποστρώματος αρκετά μικρή.

Τέλος, η τελευταία και πιο ουσιώδης παράμετρος που υπολογίζουμε είναι η σταθερά εξειδικεύσεως $k_A = k_{cat}/K_m$, η οποία όσο ψηλότερη είναι τόσο καλύτερο και αποτελεσματικότερο είναι ένα ένζυμο για κάποιο υπόστρωμα. Στους συγκεκριμένους υπολογισμούς αποδεικνύεται ότι την υψηλότερη σταθερά εξειδικεύσεως παρουσιάζει το πεπτιδικό ανάλογο XV για το αλλοένζυμο hGSTP1*C. Ταυτόχρονα, παρατηρούμε ότι η τιμή K_m του αναλόγου αυτού είναι η μικρότερη που υπολογίστηκε καθ' όλες τις κινητικές μελέτες, γεγονός που υποδεικνύει πως το αλλοένζυμο hGSTP1*C είναι το πλέον αποτελεσματικό για το συγκεκριμένο ανάλογο λόγω πολύ χαμηλής τιμής K_m , άρα και υψηλής συγγένειας με το ένζυμο σε σημείο, μάλιστα, που ξεπερνά και τις σχε-

τικές τιμές για το φυσικό υπόστρωμα της GST, τη GSH. Συνεπώς, βλέπουμε ότι για το συγκεκριμένο ανάλογο, η αντικατάσταση της Gly από τη Sar είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση στην αναγνώριση του πεπτιδίου ως υπόστρωμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBLIOGRAFIA ΠΡΩΤΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- Adang, A.E., Brussee J., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., van der Gen, A., Mulder, G.J. *Substrate specificity of rat liver glutathione S-transferase isoenzymes for a series of glutathione analogues, modified at the gamma-glutamyl moiety*. Biochem J. (1988) Oct 15' 255(2):721–724.
- Adang, A.E., Brussee, J., van der Gen, A., Mulder, G.J. *The glutathione-binding site in glutathione S-transferases. Investigation of the cysteinyl, glycyI and gamma-glutamyl domains*. Biochem. J. 269 (1990) 47–54.
- de Aguiar, E.S., Giacomazzi, J., Schmidt, A.V., Bock, H., Saraiva Pereira, M.L., Schuler-Faccini, L., Duarte, Filho, D., dos Santos, P.A., Giugliani, R., Caleffi, M., Comey, S.A., Ashton-Prolla, P. *GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening*. Rev Bras epidemiol (2012) 15:246–255
- Ahn, J., Gammon, M.D., Santella, R.M., Gaudet, M.M., Britton, J.A., Teitelbaum, Sl, Terry, M.B., Neugut, Al., Eng, S.M., Zhang, Y., Garza, C., Ambrosone, C.B. *Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk*. Carcinogenesis 27: (2006) 1876–1882
- Anantharaman, D., Chaubal, PM., Kannan, S., Bhisey, RA., Mahimkar, MB. *Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator*. Carcinogenesis 28: (2007) 1455–1462
- Anderson, M. E. *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation*. Chem. Biol. Interact. (1998) 11–112,1
- Ang, W.H., Khalaila, I., Allardyce, C.S., Juillerat-Jeanneret, L., Dyson, P.J., *Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance*. J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 1382–1383.

Armstrong, R. N. *Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases* Chemical Research in Toxicology (1997) vol. 10, no. 1, pp. 2–18.

Ascione, A., Cianfriglia, M., Dupuis, M.L., Mallano, A., Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Pezzola, S., Caccuri, A.M., Cancer Chemother. *The glutathione S-transferase inhibitor 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol overcomes the MDR1-P-glycoprotein and MRP1-mediated multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells.* Pharmacol. 64 (2009) 419–424.

Awasthi, S., Srivastava, S. K., Ahmad, F., Ahmad, H., Ansari, G. A. *Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate.* Biochim. Biophys. Acta (1993) 1164, 173.

Axarli, I., Labrou, N.E., Petrou, C., Rassias, N., Cordopatis, P., Clonis, Y.D., *Novel sulfonamide-based bombesin analogues for targeted cancer chemotherapy.* Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 2009–2016.

Berhane, K., Mannervik, B., *Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu, and pi.* Mol. Pharmacol. 37 (1990) 251–254.

Black, S.M., Beggs, J.D., Hayes, J.D., Bartoszek, A., Muramatsu, M., Sakai, M., Wolf, C.R., *Expression of human glutathione S-transferases in Saccharomyces cerevisiae confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil.* Biochem. J. 268 (1990) 309–31

Blanz, J., Mewes, K., Ehninger, G., Proksch, B., Waidelich, D., Greger, B., Zeller, K.P. *Evidence for oxidative activation of mitoxantrone in human, pig, and rat.* Drug Metab. Dispos. 19 (1991) 871–880.

Boyle, P., and B. Levin. *World Cancer Report 2008.* Lyon: International Agency for Research on Cancer (2008) (IARC), 14–15.

Burg, D., Filippov, D. V., van Boom, J. H., Hermanns, R., van der Marel, G. A., Mulder G. J., *Peptidomimetic Glutathione Analogues as Novel GT Stable GST Inhibitors,* Bioorganic & Medicinal Chemistry 10 (2002a) 195–205

Burg, D., Wielinga, P., Zelcer, N., Saeki, T., Mulder, G.J., Borst, P. *Inhibition of the multidrug resistance protein 1 (MRP1) by peptidomimetic glutathione-conjugate analogs.* Mol Pharmacol. (2002b) Nov' 62(5):1160–1166.

- Burg, D., Riepsaame, J., Pont, C., Mulder, G., van de Water, B. *Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling*. *Biochem Pharmacol* (2006) 71:268–277.
- Cacciatore, I., Caccuri, A. M., Di Stefano, A., Luisi, G., Nalli, M., Pinnen, F., Ricci, G., Sozio P., *Synthesis and activity of novel glutathione analogues containing an urethane backbone linkage* *Il Farmaco* (2003) 58, 787–793.
- Cacciatore, I., Caccuri, A.M., Cocco, A., De Maria, F., Di Stefano A., Luisi, G., Pinnen, F., Ricci, G., Sozio, P., Turella, P., *Potent isozyme-selective inhibition of human glutathione S-transferase A1-1 by a novel glutathione S-conjugate*. *Amino Acids* 29 (2005) 255–261.
- Cairns, J., Wright, C., Cattan, A.R., et al. *Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas*. *J Pathol* (1992) 166:19 - 25.
- Calderón, M., Quadir, M.A., Strumia, M., Haag, R., *Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers*. *Biochimie*, (2010) 92, 1242–1251.
- Carini, M. et al. *Mass spectrometry for detection of 4-hydroxytrans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins*. *Mass Spectrom. Rev.* (2004) 23, 281–305
- Carlsten, C., Sagoo, G.S., Frodsham, A.J., Burke, W., Higgins, J.P. *Glutathione S-transferase M1 (GStM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGe review and meta-analysis*. *Am J epidemiol* (2008) 167:759–774
- Cesareo, E., Parker, L.J., Pedersen, J.Z., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P., Pastore, A., Federici, G., Caccuri, A.M., Ricci, G., Adams, J.J. et al. *Nitrosylation of human glutathione transferase P1-1 with dinitrosyl diglutathionyl iron complex in vitro and in vivo*. *J. Biol. Chem.* (2005) 280 42172–42180.
- Chen, W.J., de Smidt, P.C., Armstrong, R.N., *Stereoselective product inhibition of glutathione S-transferase*. *Biochem Biophys Res Commun* (1986) 141:892–7.
- Chow, E.K., Zhang, X.Q., Chen, M., Lam, R., Robinson, E., Huang, H.J., et al. *Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment*. *Sci Transl Med* (2011) 3:1-11.
- Chu, G. *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair*. *J Biol. Chem.* 269 (1994) 787–789.

Clark, A.G., Debnam, P., *Inhibition of glutathione S-transferases from rat liver by S-nitrosL-glutathione*. Biochem Pharmacol (1988) 37:3199–201.

Cnubben, N.H., Rommens, A.J., Oudshoorn, M.J., Van Bladeren, P.J., *Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiotepa and transport of its metabolite monogluthionylthiotepa in human MCF-7 breast cancer cells*. Cancer Res. 58 (1998) 4616–4623.

Coles, B., Nowell, S.A., MacLeod, S.L., Sweeney, C., Lang, N.P., Kadlubar, F.F., *The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk*. Mutat. Res. (2001) 482:3–10

Comstock, K.E. et al. *A comparison of the enzymatic and Physicochemical properties of human glutathione transferase M4-4 and three other human mu class enzymes*. Arch. Biochem. Biophys. (1994) 311, 487–495

Cui, H., Shen, J., Lu, D., Zhang, T., Zhang, W., Sun, D., Wang, P.G., *4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy*. Cancer Chemother. Pharmacol. 62 (2008) 509–515.

David, G., Bostwick, M.D., Isabelle Meiers, M.D., Jonathan, H., Shanks, M.D., *Glutathione S-transferase: differential expression of α , μ , and π isoenzymes in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostatic adenocarcinoma* Human Pathology (2007) 38, 1394–1401

Dirven, H.A., van Ommen, B., Van Bladeren, P.J. *Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione*. Cancer Res. (1994) 54, 6215–6220.

Dirven, H.A., Megens, L., Oudshoorn, M.J., Dingemans, M.A., van Ommen, B., van Bladeren, P.J., *Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione S-transferases*. Chem. Res. Toxicol. 8 (1995) 979–986.

Dirven, H.A., van Ommen, B., van Bladeren, P.J., *Glutathione conjugation of alkylating cytostatic drugs with a nitrogen mustard group and the role of glutathione s-transferases*, Chem. Res. Toxicol. 9 (1996) 351–360.

- Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., Edwards, R., *Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily*. Journal of Experimental Botany (2009) vol. 60, no. 4, pp. 1207–1218
- Douglas, K. T., Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. Eds., *In Offprints from Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* Wiley & Sons: New York (1989) Part A.
- Dourado, Daniel F.A.R., Alexandrino Fernandes, Pedro, Ramos, Maria João, *Mammalian Cytosolic Glutathione Transferases Current Protein and Peptide Science* (2008) 9, 325–337 325
- Dulik, D.M., Fenselau, C., Hilton, J., *Characterization of melphalan-glutathione adducts whose formation is catalyzed by glutathione transferases*. Biochem. Pharmacol. 35 (1986) 3405–3409.
- Duncan R. *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nat Rev Cancer (2006) 6:688–701.
- Dunna, N.R., Vure, S., Sailaja, K., Surekha, D., Raghunadharao, D., Rajappa, S., Vishnupriya, S., *Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia*. Asian Pac J Cancer Prev (2013) 14:2221–2224
- Economopoulos, K.P., Sergentanis, T.N., *GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis*. Eur J Cancer (2010) 46:1617–1631
- Edwards, R., Dixon, D.P., *Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione transferase superfamily*. In Molecular Ecotoxicology of Plants, ed. H Sander-mann, Ecological Studies Vol. 170 (2004) pp. 17–50. Heidelberg: Springer Verlag
- Evans, J.F., Leville, C., Mancini, J.A., Prasit, P., Therien, M., et al. *5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a quinolone class of leukotriene synthesis inhibitors*. Mol. Pharmacol. (1991) 40:22–27
- Evans, W.E., Relling, M.V., *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics*. Science (1999) 286:487–91.
- Federici, L., Lo Sterzo, C., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G., Caccuri, A.M., *Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases*. Cancer Res. 69 (2009) 8025–8034.

- Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., *Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue*. J. Biol. Chem. (1998) 273:329–37
- Findlay, V. J., Townsend, D. M., Saavedra, J. E., Buzard, G. S., Citro, M. L., Keefer, L. K., Ji, X., Tew, K. D. *Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug*. Mol. Pharmacol. (2004) 65 (5), 1070-1079.
- Fryer, A.A., Ramsay, H.M., Lovatt, T.J., Jones, P.W., Hawley, C.M., Nicol, D.I., Strange, R.C., Harden, P.N. *Polymorphisms in glutathione S-transferases and non-melanoma skin cancer risk in Australian renal transplant recipients*. Carcinogenesis (2005) 26:185–191
- Gao, L.B., Pan, X.M., Li, L.J., Liang, W.B., Bai, P., Rao, L., Su, X.W., Wang, T., Zhou, B., Wei, Y.G., Zhang, L., *Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to risk of cervical neoplasia: an evidence-based meta-analysis*. PloS ONE (2011) 6:e20157
- Gaudiano, G., Koch, T.H., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Ravagnan, G., Serafino, A., Sinibaldi-Vallebona, P., *Lack of glutathione conjugation to adriamycin in human breast cancer MCF-7/DOX cells. Inhibition of glutathione S-transferase p1-1 by glutathione conjugates from anthracyclines*. Biochem. Pharmacol. 60 (2000) 1915–1923.
- Gibbs, J.P., Czerwinski, M., Slattery, J.T., *Busulfan-glutathione conjugation catalysed by human liver cytosolic glutathione s-transferases*. Cancer Res. 56 (1996) 3678–3681.
- Gilbert, L., Elwood, L.J., Merino, M., et al. *A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer*. J Clin Oncol (1993) 11:49 - 58.
- Greco, F., Vicent, M.J., *Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines*. Adv Drug Deliv Rev (2009) 61:1203-13.
- Grignon, D.J., Abdel-Malak, M., Mertens W.C., et al. *Glutathione S-transferase expression in renal cell carcinoma: a new marker of differentiation*. Mod Pathol (1994) 7:186 - 9.
- Guengerich, F.P., McCormick, W.A., Wheeler, J.B. *Analysis of the kinetic mechanism of haloalkane conjugation by mammalian Theta-class glutathione transferases*. Chem. Res.Toxicol. (2003)16:1493–99
- Hamilton, D.S., Zhang, X., Ding, Z., Hubatsch, I., Mannervik, B., Houk, K.N., Ganem, B., Creighton, D.J., *Mechanism of the glutathione transferase-catalyzed conversion of anti-*

- tumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts*. J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 15049–15058.
- Hanigan, M.H., *Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis*. Chem Biol Interact (1998) 111–112:333–42.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J. *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. (1995) 30:445–600
- Hayes, J.D., McLellan, LI. *Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress*. Free Radic. Res. (1999) 31:273–300
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. *Glutathione Transferases* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (2005) 45:51–88
- Holm, P.J., Morgenstern, R., Hebert, H., *The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals*. Biochim Biophys Acta. (2002) Feb 11' 1594(2):276–85.
- Horton, J.K., Roy, G., Piper, J.T., Van Houten, B., Awasthi, Y.C., Mitra, S., Alaoui-Jamali, M.A., Boldogh, I., Singhal, S.S., *Characterization of a chlorambucil-resistant human ovarian carcinoma cell line overexpressing glutathione S-transferase mu*. Biochem. Pharmacol. 58 (1999) 693–702.
- Howells, R.E., Redman, C.W., Dhar, K.K., Sarhanis, P., Musgrove, C., Jones, Pw., Alldersea, J., Fryer, A.A., Hoban, P.R., Strange, R.C. *Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer*. Clin Cancer Res (1998) 4:2439–2445
- Ishikaw, T., Ali-Osman, F., *Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells: Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance* J. Biol. Chem. 268 (1993) 20116–20125.
- Jabr-Milane, L.S., van Vlerken, L.E., Yadav, S., Amiji, M.M., *Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance*. Cancer Treat Rev (2008) 34:592–602

- Jakobsson, P.J., Thorén, S., Morgenstern, R., Samuelsson, B., *Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999a) 96:7220–25
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., *Common structural features of MAPEG: a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism*. Protein Sci. Mar (1999b) 8(3): 689–692.
- Ji, X., Pal, A., Kalathur, R., Hu, X., Gu, Y., Saavedra, J.E., Buzard, G.S., Srinivasan, A., Keefer, L.K., Singh, S.V., *Structure-Based Design of Anticancer Prodrug PABA/NO*. Drug Des. Devel. Ther. 2 (2008) 123–130.
- Johansson, A.S., Stenberg, G., Widersten, M., Mannervik, B., *Structure±Activity Relationships and Thermal Stability of Human Glutathione Transferase P1-1 Governed by the H-site Residue 105* J. Mol. Biol. (1998) 278, 687±698
- Johansson, A.S., Mannervik, B. *Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones*. J. Biol. Chem. (2001) 276:33061–65
- Josephy, P.D., Hindawi, S. *Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology Access to Research Human Genomics and Proteomics* Volume (2010) Article ID 876940, 14 pages doi:10.4061/2010/876940
- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., *Pluronic((R)) block copolymers for overcoming drug resistance in cancer*. Adv Drug Deliv Rev (2002) 54:759-79
- Keen, J.H., Jakoby, W.B., *Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione*. J. Biol. Chem. (1978) 253:5654–57
- Kibria, G., Hatakeyama, H., Harashima, H., *Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system*, Arch. Pharm. Res. (2014) 37:4–15
- Kraggerud, S.M., Oldenburg, J., Alnaes, G.I., Berg, M., Kristensen, V.N., Fossa, S.D., Lothe, R.A., *Functional glutathione S-transferase genotypes among testicular germ cell tumor survivors: associations with primary and post-chemotherapy tumor histology*. Pharmacogenet Genomics (2009) 19:751–759

- Kuhnert, D.C., Sayed, Y., Mosebi, S., Sayed, M., Sewell, T., Dirr, H.W. *Tertiary Interactions Stabilise the C-terminal Region of Human Glutathione Transferase A1-1: a Crystallographic and Calorimetric Study*. J. Mol. Biol. (2005) 349, 825–838.
- Kunze, T., *Phosphono analogues of glutathione as new inhibitors of glutathione S-transferases*, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (1996) 329, 503–509
- Kunze T., Heps, S., *Phosphono analogues of glutathione: Inhibition of glutathione transferases, metabolic stability and uptake by cancer cells*, Biochem. Pharmacol. (2000) 59, 973–981
- Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., *Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1*. Biochemistry (2004) 43:352–61
- Lee, C.C., MacKay, J.A., Frechet, J.M.J., Szoka, F.C., *Designing dendrimers for biological applications*. Nat Biotechnol (2005) 23:1517–26.
- Lorusso, D., Mainenti, S., Pietragalla, A., Ferrandina, G., Foco, G., Masciullo, V., Scambia, G., *Brostallicin (PNU-166196), a new minor groove DNA binder: preclinical and clinical activity*. Expert Opin. Invest. Drugs 18 (2009) 1939–1946.
- Lovrić, E., Gatalica, Z., Eyzaguirre, E., Kruslin, B. *Expression of maspin and glutathione S-transferase-pi in normal human prostate and prostatic carcinomas*. Appl Immunohistochem Mol Morphol (2010) 18:429–432
- Lucente, G., Luisi, G., Pinnen, F., *Design and synthesis of glutathione analogues*. Il Farmaco (1998) 53, 721.
- Lyttle, M.H., Hocker, M.D., Hui, H.C., Caldwell, C.G., Aaron, D.T., Engqvist Goldstein, A., Flatgaard, J.E., Bauer, K.E.J., *Isozyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis*. Med. Chem. (1994) 37, 189.
- Maekawa, K., Hamaguchi, T., Saito, Y., Tatewaki, N., Kurose, K., Kaniwa, N., Eguchi Nakajima, T., Kato, K., Yamada, Y., Shimada, Y., Yoshida, T., Kamatani, N., Ura, T., Saito, M., Muro, K., Fuse, N., Yoshino, T., Doi, T., Otsu, A., Saijo, N., Sawada, J., Okuda, H., Matsumura, Y., *Genetic variation and haplotype structures of the glutathione S-transferase genes GSTA1 and GSTA2 in Japanese colorectal cancer patients*. Drug Metab Pharmacokinet (2011) 26:646–658

Mannervik, C., Guthenberg, I., Jakobson, M., *Warholm Glutathione conjugation: reaction mechanism of glutathione S-transferase AA*. Aitio (Ed.), Conjugation Reactions in Drug Bio-transformation, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978), pp. 101–110

Marnett, L.J., Riggins, J.N., West, J.D., *Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein*. J. Clin. Invest. (2003) 111:583–93

Martinez, V., Kennedy, S., Doolan, P., Gammell, P., Joyce, H., Kenny, E., Prakash Mehta, J., Ryan, E., O'Connor, R., Crown, J., Clynes, M., O'Driscoll, L., *Drug metabolism-related genes as potential biomarkers: analysis of expression in normal and tumour breast tissue*. Breast Cancer Res treat (2008) 110:521–530

Matsushita, N., Aritake, K., Takada, A., Hizue, M., Hayashi, K., et al. *Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects*. Jpn. J. Pharmacol. (1998) 78:11–22

McIlwain, C.C., Townsend, D.M., Tew, K.D., *Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy*, Oncogene (2006) 25, 1639–1648 & 2006 Nature Publishing Group

Minhas, H.S., Thornalley, P.J., *Comparison of the delivery of reduced glutathione into P388D1 cells by reduced glutathione and its mono- and diethyl ester derivatives*. Biochem. Pharmacol. (1995) 49, 1475.

Morgan, A.S., Ciaccio, P.J., Tew, K.D., Kauvar, L.M., *Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines*. Cancer Chemother. Pharmacol. 37 (1996) 363–370.

Morrow, C.S., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., *Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin*. Biochem Pharmacol (1998) 56:1013–21.

Murray, G.I., Taylor, V.E., McKay, J.A., et al. *The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer*. J Pathol (1995) 177:147- 52.

Nagle, C.M., Chenevix-trench, G., Spurdle, A.B., Webb, P.M. *The role of glutathione S-transferase polymorphisms in ovarian cancer survival*. Eur. J. Cancer (2007) 43:283–290

- Nebert, D.W., *Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?* Am. J. Hum. Genet. (1997) 60: 265–71.
- Nobili, S., Landini, I., Giglioni, B., Mini, E., *Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance.* Curr Drug Targets (2006) 7:861-79.
- Oakley, A., *Glutathione transferases: a structural perspective,* Drug Metabolism Reviews, (2011) 43(2): 138–151
- Oguztuzun, S., Abu-Hijleh, A., Coban, T., Bulbul, D., Kilic, M., Iscan, M. *GST isoenzymes in matched normal and neoplastic breast tissue.* Neoplasma (2011) 58:304–310
- Ong, L.K., Clark, A.G., *Inhibition of rat liver glutathione S-transferases by glutathione conjugates and corresponding L-cysteines and mercapturic acids.* Biochem Pharmacol (1986) 35:651–4.
- Ouwerkerk-Mahadevan, S., van Boom, J.H., Dreef, T.M., Ploemen, J.H., Meyer, D.J., Mulder, G.J., *Glutathione analogues as novel inhibitors of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes, as well as of glutathione conjugation in isolated rat hepatocytes and in the rat in vivo.* Biochem. J. (1995) 308, 283.
- Pedersen, J.Z., De Maria, F., Turella, P., Federici, G., Mattei, M., Fabrini, R., Dawood, K.F., Massimi, M., Caccuri, A.M., Ricci, G., *Glutathione transferases sequester toxic dinitrosyl-iron complexes in cells. A protection mechanism against excess nitric oxide.* J. Biol. Chem. 282 (2007) 6364–6371.
- Pezzola, S., Antonini, G., Geroni, C., Beria, I., Colombo, M., Broggin, M., Mongelli, N., Leboffe, L., MacArthur, R., Mozzi, A.F., Federici, G., Caccuri, A.M., *Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation.* Biochemistry 49 (2010) 226–235.
- Di Pietro, G., Magno, L.A., Rios-Santos, F., *Glutathione S-transferases: an overview in cancer research.* Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol. (2010) 6:153–170
- Ploemen, J., van Ommen, B., van Bladeren, P.J. *Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate.* Biochem. Pharmacol. (1990) 40, 1631.
- Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M.R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhagen, G., Kohn, K.W., Cancer Invest. 12 (1994) 530–542. G. Chu, J Biol. Chem. 269 (1994) 787–789.

Pullarkat, S.T., Stoehlmacher, J., Ghaderi, V., Xiong, Y.P., Ingles, S.A., Sherrod, A., et al. *Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy*. Pharmacogenomics J (2001) 1:65–70.

Raijmakers, M.T., Steegers, E.A., Peters, W.H. *Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues*. Hum Reprod (2001) 16:2445–2450

Ranson, H., Rossiter, L., Ortell, F., Jensen, B., Wang, X., et al. *Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector Anopheles gambiae*. Biochem. J. (2001) 359:295–304

Raza, A., Galili, N., Smith, S., Godwin, J., Lancet, J., Melchert, M., Jones, M., Keck, J.G., Meng, L., Brown, G.L., List, A., *Phase 1 multicenter dose-escalation study of ezatiostat hydrochloride (TLK199 tablets), a novel glutathione analog prodrug, in patients with myelodysplastic syndrome*. Blood 113 (2009) 6533–6540.

Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L., Filomeni, G., Federici, G., Caccuri, A.M., *7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole Derivatives, a New Class of Suicide Inhibitors for Glutathione S-Transferases: Mechanism of action of potential anticancer drugs* J. Biol. Chem. 280 (2005) 26397–26405.

Ruscoe, J.E., Rosario, L.A., Wang, T., Gaté, L., Arifoglu, P., et al. *Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GST π) influences cell proliferation pathways*. J. Pharmacol. Exp. Ther. (2001) 298:339–45

Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A.-M., *Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance*, Archives of Biochemistry and Biophysics 500 (2010) 116–122

Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Blasius, R., Dicato, M., Trentesaux, C., Diederich, M., *Transcriptional and post-transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1 expression during butyric acid-induced differentiation of K562 cells*. Leuk Res (2006) 30:561–568

Settheetham-Ishida, W., Yuenyao, P., Kularbkaew, C., Settheetham, D., Ishida, T., *Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) polymorphisms in cervical cancer in Northeastern Thailand*. Asian Pac J Can Prev (2009) 10:365–368

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., *Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily*, Biochemical Journal, (2001) vol. 360, no. 1, pp. 1–16,
- Sigal, A., Rotter, V., *Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome.*, Cancer Res. 60 (2000) 6788–6793.
- Singh, S., *Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death* (2014) Cancer Chemother. Pharmacol.
- 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., *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. (1993) 232, 192–212.
- Smith, M.T., Evans, C.G., Doane-Setzer, P., Castro, V.M., Tahir, M.K., Mannervik, B., *Denitrosation of 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea by class mu glutathione transferases and its role in cellular resistance in rat brain tumor cells*. Cancer Res. 49 (1989) 2621–2625
- Stiriba, S.E., Frey, H., Haag, R., *Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy*. Angew Chem Int Edit (2002) 41:1329-34.
- Stuart, D.D., Kao, G.Y., Allen, T.M., *A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1*. Cancer Gene Ther (2000) 7:466-75.
- Sundberg, A.G., Nilsson, R., Appelkvist, E.L., et al. *Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues*. Pharmacol Toxicol (1993) 72:321- 31.
- Suzuki, T., Nishio, K., Tanabe, S., *The MRP family and anticancer drug metabolism*. Curr Drug Metab (2001) 2:367–377.
- Svenson, S., Tomalia, D.A., *Commentary - dendrimers in biomedical applications - reflections on the field*. Adv Drug Deliv Rev (2005) 57:2106-29.
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M.M., *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov. (2006) Mar'5(3):219-34.
- Tars, K., Larsson, A.-K., Shokeer, A., Olin, B., Mannervik, B., Kleywegt, G.J., *Structural basis of the suppressed catalytic activity of wild-type human glutathione transferase T1-1*

compared to its W234R mutant, Journal of Molecular Biology (2006) vol. 355, no. 1, pp. 96–105

Tew, K.D., Dutta, S., Schultz, M., *Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents*. Adv. Drug Deliv. Rev. 26 (1997) 91–104

Townsend, D., Tew, K., *Cancer drugs, genetic variation and the glutathione S-transferase gene family*. Am J. Pharmacogenomics (2003) 3:157–172

Turella, P., Filomeni, G., Dupuis, M.L., Ciriolo, M.R., Molinari, A., De Maria, F., Tombesi, M., Cianfriglia, M., Federici, G., Ricci, G., Caccuri, A.M., *A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells*. J Biol Chem. (2006) 281(33):23725–23732.

Van Nguyen, T., Janssen, M.J., Van Oijen, M.G.H., Bergevoet, S.M., Te Morsche, R.H.M., Van Asten, H.A.G.H., Laheij, R.J.F., Peters, W.H.M., Jansen, J.B.M.J. *Genetic polymorphisms in GStA1, GStP1, GStt1, and GStM1 and gastric cancer risk in a Vietnamese population*. Oncology Res (2010) 18:349–355

Vergote, I., Finkler, N., del Campo, J., Lohr, A., Hunter, J., Matei, D., Kavanagh, J., Vermorken, J.B., Meng, L., Jones, M., Brown, G., Kaye, S., *Phase 3 randomised study of canfosfamide (Telcyta ®, TLK286) versus pegylated liposomal doxorubicin or topotecan as third-line therapy in patients with platinum-refractory or -resistant ovarian cancer*. Eur. J. Cancer 45 (2009) 2324–2332.

Wheeler, J.B., Stourman, N.V., Their, R., Dommermuth, A., Vuilleumier, S., et al. *Conjugation of haloalkanes by bacterial and mammalian glutathione transferases: mono- and dihalomethanes*. Chem. Res. Toxicol. (2001) 14:1118–27

Wolf, C.R., Macpherson, J.S., Smyth, J.F., *Evidence of the metabolism of mitozantrone by microsomal glutathione transferases and 3-methylcholantrene inducible glucuronosyl transferases*. Biochem. Pharmacol. 35(1986) 1577–1581.

Wu, J.H., Batist, G., *Glutathione and glutathione analogues; Therapeutic potentials*, Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 3350–3353

Xie, P., Liang, Y., Liang, G., Liu, B., *Association between GSTP1 Ile105val polymorphism and glioma risk: a systematic review and meta-analysis*. Tumor Biol (2014) 35:493–499

- Xu, Y., Wang, J., Dong, W. *GSTM3 A/B polymorphism and risk for head and neck cancer: a meta-analysis*. PloS ONE 9:e83851 (2014).
- Yao, L., Ji, G., Gu, A., Zhao, P., Liu, N. *An updated pooled analysis of glutathione S-transferase genotype polymorphisms and risk of adult gliomas*. Asian Pac J Cancer Prev (2012) 13:157–163
- Zeng, X., Morgenstern, R., Nyström, A.M., *Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance*, Biomaterials 35 (2014) 1227-1239
- Zhang, Y., Ni, Y., Zhang, H., Pan, Y., Ma, J., Wang, L., *Association between GSTM1 and GSTT1 allelic variants and head and neck squamous cell carcinoma*. PloS ONE (2012) 7:e47579
- Zhou, Y., Zhuang, W., Yin, Y.Q., Liu, G.J., Wu, T.X., Yao, X., Du, L., Wei, M.L., Wu, X.T., Wang, H., *Glutathione S-transferase M1 null genotype associated with gastric cancer among Asians*. Dig Dis Sci (2010) 55:1824–1830

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΤΕΤΑΡΤΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J.-X., Buolamwini, J., *Molecular Cloning, Characterization, and Expression in Escherichia coli of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-Transferase Pi Gene Variants*. J Biol Chem. (1997) Apr 11; 272(15):10004-12
- Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, G.C.W., Wolf, C.R., *Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer*. Carcinogenesis, 18 (1997), pp. 641–644
- Johansson, A.-S., Stenberg, G., Widersten, M., Mannervik, B., *Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105*. Journal of Molecular Biology Volume 278, Issue 3, 8 May (1998), Pages 687–698
- Kong, K.-H., Inoue, H., Takahashi, K., *Site-directed mutagenesis of amino acid residues involved in the glutathione binding of human glutathione S-transferase P1-1* J. Biochem., 112 (1992), pp. 725–728
- Mannervik, B., Guthenberg, C., Jakobson, I., Warholm, M., *Glutathione conjugation: reaction mechanism of glutathione S-transferase A A. Aitio (Ed.), Conjugation Reactions in*

Drug Biotransformation, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978), pp. 101–110

Manoharan, T.H., Gulick, A.M., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Fahl, W.E., *Mutational substitution of residues implicated by crystal structure in binding the substrate glutathione to human glutathione S-transferase* J. Mol. Biol., 226 (1992), pp. 319–322

Peklak-Scott, C., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S., *The role of glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in the cellular detoxification of cisplatin* Mol Cancer Ther. (2008) October; 7(10): 3247–3255

Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D.H., Harries, L.W., Wolf, C.R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P., Haugen, A., *Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk*. Carcinogenesis, 18 (1997), pp. 1285–1289

Widersten, M., Kolm, R.H., Björnstedt, R., Mannervik, B., *Contribution of five amino acid residues in the glutathione-binding site to the function of human glutathione transferase P1-1* Biochem. J., 285 (1992) pp. 377–381

Zimniak, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S.S., Srivastava, S.K., Awasth, S., Awasthi, Y.C., *Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties* Eur. J. Biochem. (1994) 224, 893–899

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κλώνης, Ι.Δ., *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010

Πούλιου, Φ., *Μελέτη πρόδρομων N,O-ετεροκυκλικών δομών ως αναστολέων της τρανσφεράσης γλουταθειόνης P1-1 ανθρώπου*, Διατριβή ΜΔΕ, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2013.

Χρονοπούλου, Ε., *Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου Μεταφοράση της Γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2013

