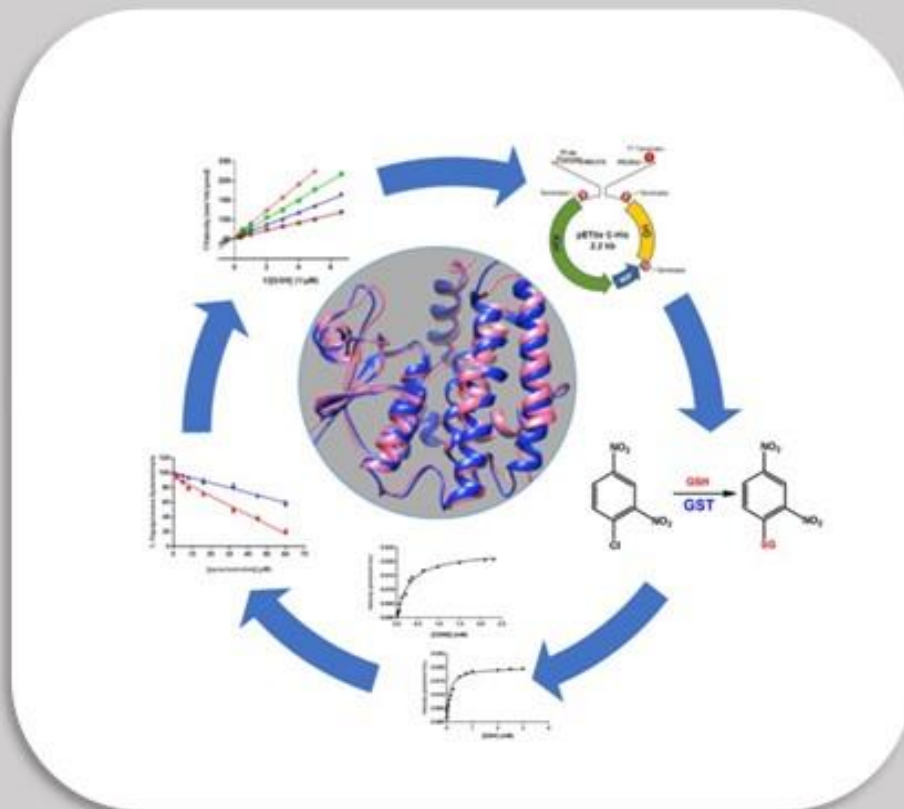


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανασχεδιασμός της δομής του ενζύμου
τρανσφεράση της γλουταθειόνης με στόχο την τροποποίηση
των καταλυτικών και δομικών του ιδιοτήτων



ΠΟΥΛΙΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Άνασχεδιασμός της δομής του ενζύμου
τρανσφεράση της γλουταθειόνης με στόχο την τροποποίηση
των καταλυτικών και δομικών του ιδιοτήτων**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΑΘΗΝΑ 2018

Η ανάθεση του θέματος της διδακτορικής διατριβής, «Ανασχεδιασμός της δομής του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης με στόχο την τροποποίηση των καταλυτικών και δομικών του ιδιοτήτων.», έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος (18-03-2014). Ο ορισμός της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 7η/24-01-2014).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λάμπρου Νικόλαος (<i>Επιβλέπων</i>)	Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κλώνης Ιωάννης (<i>Μέλος</i>)	Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Φλεμετάκης Εμμανουήλ (<i>Μέλος</i>)	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λάμπρου Νικόλαος	Καθηγητής, Γ.Π.Α. (<i>Επιβλέπων Καθηγητής</i>)
Κλώνης Ιωάννης	Καθηγητής, Γ.Π.Α.
Φλεμετάκης Εμμανουήλ	Αναπληρωτής Καθηγητής, Γ.Π.Α.
Βόντας Ιωάννης	Καθηγητής, Γ.Π.Α.
Μάδεσης Παναγιώτης	Ερευνητής Β, ΕΚΕΤΑ
Βλαχάκης Δημήτριος	Επικ. Καθηγητής, ΓΠΑ
Τάνη Ελένη	Λέκτορας, Γ.Π.Α.

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χρηματοδότησης από το Πρόγραμμα <<Ερευνητικά Προγράμματα Αριστεία IKY/Siemens>>.



IKY



ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ
STATE SCHOLARSHIPS FOUNDATION

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Pouliou, Fotini, Perperopoulou, Fereniki, Labrou, Nikolaos E. (2017). Comparative Analysis of Two Stress-Inducible *tau* Class Glutathione Transferases from *Glycine max* Revealed Significant Catalytic and Structural Diversification. *Protein and peptide letters*, (14): 22-935.
- F. Perperopoulou, F. Pouliou, N. Labrou (2017). Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases., *Critical reviews in Biotechnology*, 43, 1-18.
- E. Chronopoulou, F. S. Ataya, F. Pouliou, F. Perperopoulou, N. Georgakis, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, E. Ioannou, N. E. Labrou (2017). Structure, evolution, and functional roles of plant glutathione transferases. In: Hossain M., Mostofa M., Diaz-Vivancos P., Burritt D., Fujita M., Tran LS. (eds) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer, pp 195-213.
- E. Chronopoulou, N. Georgakis, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, F. Perperopoulou, F. Pouliou, E. Vasilopoulou, E. Ioannou, F. S. Ataya, N. E. Labrou (2017). Plant Glutathione Transferases in Abiotic Stress Response and Herbicide Resistance. In: Hossain M., Mostofa M., Diaz-Vivancos P., Burritt D., Fujita M., Tran LS. (eds) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer, pp 215-233.
- E. Chronopoulou, K. Kontouri, M. Chantzikonstantinou, F. Pouliou, F. Perperopoulou, G. Voulgari, E. Bosmali, I. Axarli, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Tsaftaris, and N. E. Labrou (2015). Plant glutathione transferases: structure, antioxidant catalytic function and in planta protective role in biotic and abiotic stress, *Current Chemical Biology*, 8, 58-75.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Pouliou Fotini, Labrou Nikolaos (2017). Engineering of Tau class GSTs for the development of biosensor. 2nd International Conference on Enzymology and Molecular Biology, 20-21 March, Rome, Italy. Best poster award.
- Pouliou Fotini, Labrou Nikolaos (2017). Investigation of the interaction of the tau class glutathione transferase with pesticides by differential scanning fluorimetry. 4th European Chemistry Congress. 11-13 May, Barcelona, Spain.
- F. Perperopoulou, Pouliou, M. Chantzikonstantinou, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Papageorgiou, Y. D. Clonis, N.E. Labrou. Evaluation of catalytic efficiency and substrate promiscuity in glutathione transferases from photosynthetic organisms for bioremediation. 6th European Bioremediation Conference, 30-2 July, 2015, Chania, Greece.
- F. Pouliou, F. Perperopoulou, N. E. Labrou (2014). Development of novel catalytic bioscavengers for herbicide detoxification. 8th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment & 14th Symposium on chemistry and fate of modern pesticides September 18-21, 2014, Ioannina, Greece. September 18-21, 2014, Ioannina, Greece.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης μου πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του *Καθηγητή* Νικόλαου Λάμπρου.

Στον κύριο Λάμπρου οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες. Τον ευχαριστώ τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση όσο και για τη ψυχολογική υποστήριξη καθώς και τις ουσιαστικές διορθώσεις καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διατριβής. Ένας άνθρωπος, πέρα από Καθηγητής, ο οποίος με την υπομονή και την επιμονή του με έκανε τον επιστημονικά, και όχι μόνο, σκεπτόμενο άνθρωπο που είμαι σήμερα. *Τον ευχαριστώ από καρδιάς για ακόμα μια φορά.*

Ο κ. Κλώνης, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, με βοήθησε σημαντικά με τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του. Τον ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα πρόθυμος για επιστημονικές και όχι μόνο συζητήσεις. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Φλεμετάκη, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς ήταν πάντα πρόθυμος να δώσει λύσεις σε όποια προβλήματα κι αν προκύπταν. Θέλω, επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, τον κύριο Βόντα Ιωάννη, τον ερευνητή ΕΚΕΤΑ κύριο Μάδεση Παναγιώτη, τον κύριο Βλαχάκη Δημήτριο και την κυρία Τάνη Ελένη, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κυρία Ευαγγελία Παππά, ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου, για τη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη φίλη και άψογη επαγγελματία Δρ Ευαγγελία Χρονοπούλου, για την καταπληκτική συνεργασία καθώς και για τη ψυχολογική και ηθική βοήθεια που απλόχερα μου πρόσφερε όποτε τη χρειάστηκα. Επίσης, οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο φίλο και εξαιρετο συνάδελφο Νικόλα Γεωργακή, με τον οποίο μοιράστηκα τις ανησυχίες μου καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Ο Νίκος με βοήθησε πολύ σε διάφορα πρακτικά ζητήματα και ήταν εκεί τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο. Ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για τη μοναδική συνεργασία και το υπέροχο κλίμα μέσα στο εργαστήριο.

Ένα ιδιαίτερο και ουσιαστικό ευχαριστώ οφείλω να πω σε ένα πολύ σημαντικό άνθρωπο της ζωής μου, που εδώ και δώδεκα ολόκληρα χρόνια είναι πάντα δίπλα μου. Δεν είναι άλλος από τη Φερενίκη Περπεροπούλου. Μαζί της μοιράστηκα την αγωνία και τον ενθουσιασμό μου, την ανησυχία και τη χαρά μου, τους προβληματισμούς και τις ανασφάλειες της καθημερινότητας.

Περάσαμε πολλά όλα αυτά τα χρόνια αλλά στο τέλος... τα καταφέραμε!

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

Συντμήσεις

ABS	Απορρόφηση
APS	Υπερθειϊκό αμμώνιο
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
BES-GSH	1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθερα-GSH-sepharose-CL6B
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
Cys	Κατάλοιπο κυστεΐνης
ddH ₂ O	Δις απιονισμένο νερό
DMSO	Διμεθυλσουλφοξείδιο
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
GSH	Γλουταθειόνη
GSSG	Οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης
GST	S-Τρανσφεράση γλουταθειόνης
GmGSTU4-4	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από σόγια, ισοένζυμο U1-1
GmGSTU5-5	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από σόγια, ισοένζυμο U5-5
IC ₅₀	Συγκέντρωση αναστολέα που δίδει 50% αναστολή ενζύμου
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο
K _{cat}	Σταθερά ταχύτητας καταλύσεως
K _m	Σταθερά Michaelis
K _i	Σταθερά διάστασης του συμπλόκου αναστολέα-ενζύμου
MmGSTA1-1	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από οικόσιτο ποντικό, ισοένζυμο A1-1
MmGSTP1-1	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από οικόσιτο ποντικό, ισοένζυμο P1-1
LB	Θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου
pH	-log[H ⁺]
PvGSTU8.1	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από φασόλι, ισοένζυμο U8.1
PvGSTU8.2	S-τρανσφεράση γλουταθειόνης από φασόλι, ισοένζυμο U8.2
rpm	Στροφές ανά λεπτό
RNS	Ενεργή μορφή αζώτου
ROS	Ενεργή μορφή οξυγόνου
Ser	Κατάλοιπο σερίνης
Sh4	Αποικία 4 από το πρώτο DNA shuffling
ShII5	Αποικία 15 από το δεύτερο DNA shuffling
ShII6	Αποικία 6 από το δεύτερο DNA shuffling
ShII7	Αποικία 7 από το δεύτερο DNA shuffling
Sh15	Αποικία 15 από το πρώτο DNA shuffling
Sh19	Αποικία 19 από το πρώτο DNA shuffling
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
Tris	Τρις(υδροξυμέθυλ)αμινομεθάνιο
T _m	Θερμοκρασία που επέρχεται 50 % μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας
Unit (U)	Ενζυμική μονάδα
V _{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
ΔA/Δt	Διαφορά οπτικής απορρόφησης ανά λεπτό
ΔG	Ελεύθερη ενέργεια Gibbs
ΔS	Εντροπία συστήματος

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1	1
Εισαγωγή.....	1
1.1 Ένζυμα και πρωτεΐνες.....	2
1.2 Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη	2
1.2.1 Δομικά στοιχεία και κατανομή της GSH.....	4
1.2.2 Σύνθεση του τριπεπτιδίου της GSH.....	5
1.2.3 Οξειδοαναγωγική και αντιοξειδωτική λειτουργία της GSH.....	5
1.3 Γενικά για τις τρανφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs).....	6
1.4 Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs	8
1.4.1 Κυτταροπλασματικές GSTs.....	8
1.4.2 Μιτοχονδριακές GSTs	11
1.4.3 Μικροσωμικές GSTs	12
1.5 Η δομή των GSTs	13
1.6 Λειτουργίες των GSTs	18
1.6.1 Καταλυτικές λειτουργίες των GSTs εξαρτώμενες από τη GSH.....	18
1.6.2 Μη καταλυτικές λειτουργίες των GSTs.....	20
1.7 Κατευθυνόμενη πρωτεϊνική εξέλιξη.....	21
1.7.1 Πρωτεϊνική μηχανική και GSTs	25
1.8 Παράγοντες που καθορίζουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών έναντι θερμοκρασίας.....	30
1.9 Βιοαισθητήρες	33
1.9.1 Εισαγωγή	33
1.9.2 Τεχνολογία του βιοαισθητήρα	35
1.9.3 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ένζυμα.....	35
1.9.4 Νανοτεχνολογία και βιοαισθητήρες (νανοβιοαισθητήρες).....	37
1.10 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs	38
1.10.1 Γεωργική βιοτεχνολογία	38
1.10.2 Ιατρική βιοτεχνολογία	39

1.10.3 Αναλυτική βιοτεχνολογία	44
1.10.4 Νανοβιοτεχνολογία	45
1.10.5 Βιοτεχνολογία περιβάλλοντος	45
1.11 Κινητική ενζύμων	48
1.11.1 Η σημασία της εξίσωσης των <i>Michaelis Menten</i>	50
1.12 Αναστολή της ενζυμικής αντιδράσης	53
1.12.1 Συναγωνιστική αναστολή	54
1.12.2 Ανταγωνιστική αναστολή	56
1.12.3 Μικτή αναστολή	57
1.12.4 Μη συναγωνιστική αναστολή.....	58
1.13 Στόχος διατριβής.....	58
Κεφάλαιο 2	60
<i>Υλικά και Μέθοδοι</i>	60
2.1 Υλικά.....	61
2.1.1 Βιολογικά Υλικά.....	61
2.1.2 Ένζυμα και πρωτεΐνες.....	61
2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια, kits και λοιπά.....	62
2.1.4 Εξοπλισμός	63
2.1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα	65
2.2 Μέθοδοι	70
2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων HI-Control 10G, DH5A, BL21 (DE3) και HI-Control BL21 (DE3) (SOLOs) του βακτηρίου <i>E.coli</i> (Competent Cells).....	70
2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	70
2.2.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	71
2.2.4 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα ...	72
2.2.5 Ανάλυση DNA και RNA σε πηκτή αγαρόζης	72
2.2.6 Κατεργασία δειγμάτων με νουκλεάση DNase I	73
2.2.7 Σύνθεση cDNA	74
2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	74

2.2.9 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA και μετάφραση	75
2.2.10 Ετερόλογος έκφραση σε στελέχη κυττάρων <i>E. Coli</i> σε υγρό θρεπτικό μέσο LB	75
2.2.11 Λύσιμο κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος	76
2.2.12 Διαπίδυση.....	76
2.2.13 Καθαρισμός GST ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή συγγένειας BES-GSH.....	76
2.2.14 Συνολικός προσδιορισμός πρωτεΐνης (Μέθοδος Bradford)	79
2.2.15 Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs.....	80
2.2.16 Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs.....	81
2.2.17 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (SA).....	82
2.2.18 Υπολογισμός Απόδοσης Καθαρισμού	82
2.2.19 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με τριχλωροακετικό Οξύ (TCA).....	82
2.2.20 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	83
2.2.21 Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	83
2.2.22 Χρώση με Goomassie Brilliant Blue R-250	84
2.2.23 Σύνθεση προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH).....	84
2.2.24 Υποκλωνοποίηση με χρήση της τεχνολογίας Expresso™.....	85
2.2.25 Υποκλωνοποίηση με χρήση της τεχνολογίας TOPO®	88
2.2.26 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα παράγωγα νιτροβενζολίου (CDNB, BDCB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl)	89
2.2.27 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH), το t-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tert-BuOOH) και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο (Benzoyl peroxide)	91
2.2.28 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο διϋδροασκορβικό οξύ (DHA).....	93
2.2.29 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο 2-2-διθειοδιαιθανόλη (HED).....	93

2.2.30 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια αιθακρινικό οξύ (EA) και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη.....	94
2.2.31 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP)	94
2.2.32 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC).....	95
2.2.33 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο fluoro-difen	95
2.2.34 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σουλφαναμίδη	96
2.2.35 Κινητική ανάλυση και υπολογισμός μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) και σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) ως προς το υπόστρωμα ενός ενζύμου	97
2.2.36 Προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50})	98
2.2.37 Σάρωση ξενοβιοτικών ενώσεων ως δυνητικών αναστολέων GST ισοενζύμων.....	98
2.2.38 Μέθοδος <i>in vitro</i> κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης (Τεχνική DNA Shuffling)	99
2.2.39 Θερμική σταθερότητα ενζύμου (T_m)	99
2.2.40 Ανάλυση βιοπληροφορικής και μοριακή μοντελοποίηση	99
2.2.41 Διαφορική φασματοσκοπία φθορισμού (DSF).....	100
Κεφάλαιο 3	101
<i>Κατευθυνόμενη εξέλιξη GST ισοενζύμων της tau τάξης</i>	101
3.1 Εισαγωγή	102
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	104
3.2.1 Βιολογικά υλικά.....	104
3.2.2 Μέθοδοι	105
3.3 Αποτελέσματα.....	120
3.3.1 Σάρωση βιβλιοθήκης πρώτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης	120
3.3.2 Δεύτερος κύκλος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης GST ισοενζύμων.....	121
3.3.3 Σάρωση βιβλιοθήκης δεύτερου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης.....	123

3.3.4 Έκφραση και καθαρισμός GST ισοενζύμων	126
3.3.5 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών για το σύστημα GSH/CDNB	127
3.3.6 Μελέτη εκλεκτικότητας ισοενζύμων	128
3.3.7 Βιοϋπολογιστική και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μορφών sh15 και sh19	131
3.3.8 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου sh4 με τη γλουταθειόνη	134
3.3.9 Υπολογισμός της ενθαλπίας μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.....	155
3.3.10 Τρίτος κύκλος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης ισοενζύμων GSTs	157
3.3.11 Σάρωση βιβλιοθήκης τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης	159
3.3.12 Έκφραση και καθαρισμός GST ισοενζύμων του τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης	161
3.3.13 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών του τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης για το σύστημα GSH/CDNB	162
3.3.14 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων του τρίτου κύκλου της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης	163
3.3.15 Θερμική σταθερότητα GST ισοενζύμων	166
3.3.16 Κινητική ανάλυση της δομικής σταθερότητας	167
3.3.17 Επίδραση θερμοκρασίας και pH στην ενζυμική δραστηριότητα.....	173
3.3.18 Σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου shII5	177
3.3.19 Θερμική δοκιμασία μετατόπισης	183
3.3.20 Μελέτη αλληλεπίδρασης του shII5 με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα μέσω θερμικής δοκιμασίας μετατόπισης	186
3.3.21 Μελέτη της δομικής αποδιάταξης πρωτεΐνης παρουσία ουρίας με φασματοσπεκτόμετρο φθορισμού.....	188
3.4 Συζήτηση.....	196
Κεφάλαιο 4	203
<i>Μελέτη και χαρακτηρισμός φυτικών GSTs</i>	203
4.1 Εισαγωγή	204

4.2 Υλικά και Μέθοδοι	206
4.2.1 Υλικά.....	206
4.2.2 Μέθοδοι	206
4.3 Αποτελέσματα.....	217
4.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση cDNA του <i>GmGSTU5-5</i>	217
4.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων <i>PvGSTU8.1</i> και <i>PvGSTU8.2</i>	217
4.3.3 Έκφραση και καθαρισμός των φυτικών ισοενζύμων	219
4.3.4 Μελέτη της εκλεκτικότητας του ισοενζύμου <i>GmGSTU5-5</i>	221
4.3.5 Κινητική ανάλυση του ισοενζύμου <i>GmGSTU5-5</i> ως προς τα υποστρώματα CDNB, CuOOH και NBD chloride	224
4.3.6 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου <i>GmGSTU5-5</i>	226
4.3.7 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων <i>PvGSTU8.1</i> και <i>PvGSTU8.2</i>	228
4.3.8 Κινητική ανάλυση τα ισοένζυμα <i>PvGSTU8.1</i> και <i>PvGSTU8.2</i> ως προς τα υποστρώματα CDNB, BDNB και NBD chloride	230
4.3.9 Θερμική σταθερότητα φυτικών ισοενζύμων	233
4.3.10 Επίδραση θερμοκρασίας και pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης	234
4.3.11 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης των GST ισοενζύμων	236
4.3.12 Θερμική διαδικασία μετατόπισης για το ισοένζυμο <i>GmGSTU5-5</i>	237
4.3.13 Σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων <i>PvGSTU8.1</i> και <i>PvGSTU8.2</i>	238
4.3.14 Βιοϋπολογιστική μελέτη και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας των <i>PvGSTU8.1</i> και <i>PvGSTU8.2</i>	242
4.3.15 Βιοϋπολογιστική και ανάλυση δομής του ισοενζύμου <i>GmGSTU5-5</i>	248
4.4 Συζήτηση.....	250
Κεφάλαιο 5	257
Μελέτη των <i>GSTA1-1</i> και <i>GSTP1-1</i> ισοενζύμων από <i>Mus musculus</i>	257
5.1 Εισαγωγή	258

5.2 Υλικά και Μέθοδοι	260
5.2.1 Βιολογικά υλικά.....	260
5.2.2 Μέθοδοι	260
5.3 Αποτελέσματα.....	267
5.3.1 Κατεργασία δειγμάτων με νουκλεάση DNase I και σύνθεση cDNA.....	267
5.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των cDNA των ισοενζύμων.....	267
5.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων <i>MmGSTA1-1</i> και <i>MmGSTP1-1</i>	267
5.3.4 Έκφραση και καθαρισμός των ισοενζύμων <i>MmGSTA1-1</i> και <i>MmGSTP1-1</i>	269
5.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων <i>MmGSTA1-1</i> και <i>MmGSTP1-1</i>	270
5.3.6 Κινητική ανάλυση των ισοενζύμων <i>MmGSTA1-1</i> και <i>MmGSTP1-1</i> για το σύστημα CDNB /GSH	273
5.3.7 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της πρωτεΐνης <i>MmGSTP1-1</i> με την S-(4-νιτροβέλζυλ)-GSH	274
5.3.8 Βιοϋπολογιστική ανάλυση και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας του ισοενζύμου <i>MmGSTA1-1</i>	291
5.4 Συζήτηση.....	295
Κεφάλαιο 6	298
<i>Ανάπτυξη ενζυμικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του pyrachlostrobin</i>	298
6.1 Εισαγωγή	299
6.2 Υλικά και Μέθοδοι	304
6.2.1 Υλικά.....	304
6.2.2 Μέθοδοι	304
6.3 Αποτελέσματα.....	308
6.3.1 Ακίνητοποίηση του μεταλλαγμένου ισοενζύμου shII5 με τη μέθοδο της διασύνδεσης (cross-link).....	308
6.3.2 Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου για το σύστημα GSH/CDNB	308
6.3.3 Προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC ₅₀) του <i>pyrachlostrobin</i> για το ακινητοποιημένο ισοένζυμο	309

6.3.4 Δομική σταθερότητα του ισοενζύμου shII5 για το ακινητοποιημένο ισοένζυμο σε σχέση με το χρόνο	310
6.3.5 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βασιζόμενη στην εκλεκτικότητα και στη δράση του ακινητοποιημένου ισοενζύμου.....	311
6.3.6 Προσδιορισμός του <i>pyrachlostrobin</i> σε δείγματα νερού με την μέθοδο που αναπτύχθηκε	313
6.4 Συζήτηση.....	316
<i>Βιβλιογραφία</i>	317

Ανασχεδιασμός της δομής του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης με στόχο την τροποποίηση των καταλυτικών και δομικών του ιδιοτήτων

Περίληψη

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι μια μεγάλη υπεροικογένεια ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ενώσεων. Οι GSTs καταλύουν τη διπλή πυρηνόφιλη σύζευξη στην οποία προάγεται η GSH προς όφελος των ηλεκτρονιόφιλων, υδρόφοβων και κυτταροτοξικών υποστρωμάτων. Το προϊόν της αντίδρασης σύζευξης εκκρίνεται από το κύτταρο, παρέχοντας έτσι έναν αμυντικό μηχανισμό έναντι των βλαβερών επιδράσεων των τοξικών ενώσεων και του οξειδωτικού στρες.

Όσον αφορά στην πρώτη ενότητα της διατριβής, έπειτα από σάρωση βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών, επιλέχθηκαν τρεις αποικίες, οι sh4, sh15 και sh19, με βάση την ενζυμική δραστικότητα για το σύστημα GSH/alachlor, οι οποίες αποτέλεσαν μήτρα για την κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη. Αυτές κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pETite, εκφράστηκαν ετερόλογα και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Ακολούθησε κινητική ανάλυση για το σύστημα GSH/CDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές. Πραγματοποιήθηκε μελέτη εκλεκτικότητας των τριών ισοενζύμων καθώς και του άγριου τύπου με διαφορετικά υποστρώματα για να ελεγχθούν πιθανές δράσεις που παρουσιάζουν και παρατηρήθηκε πως ο άγριος τύπος εμφανίζει μικρότερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τα ισοένζυμα του δεύτερου κύκλου της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης.

Επιπρόσθετα, λύθηκε η κρυσταλλοδομή του ισοενζύμου sh4 με χρήση περίθλασης ακτίνων X. Η δομή προσδιορίστηκε με ανάλυση 2,27 Å. Παρατηρήθηκε ότι το τριπεπτίδιο GIE που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εισέρχεται στην περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου και προσομοιάζει τη δομή της GSH. Έτσι, το τριπεπτίδιο GIE συντέθηκε για να ελεγχθεί αν λειτουργεί ως υπόστρωμα ή ως αναστολέας των *GmGSTU4-4*, sh4 και shII5. Επίσης, μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας φθορισμού παρατηρήθηκε πως το πεπτίδιο GIE επιφέρει το φαινόμενο της απόσβεσης στα ένζυμα, δηλαδή παρουσιάζει μείωση της έντασης του φθορισμού, γεγονός που δείχνει πως το σύμπλοκό του με το ισοένζυμο shII5 γίνεται πιο συμπαγές. Στην προσπάθεια να διερευνηθεί η πολυπλοκότητα πραγματοποιήθηκε ένας τρίτος κύκλος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Ως μήτρα αυτή τη φορά

χρησιμοποιήθηκαν οι αποικίες που εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα στον προηγούμενο κύκλο. Επιλέχθηκαν και σε αυτή την περίπτωση, να μελετηθούν τρεις αποικίες, οι shII5, shII6 και shII7, οι οποίες εμφάνισαν υψηλή δραστικότητα. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία χαρακτηρισμού των ισοενζύμων. Αξιοσημείωτη είναι η ειδική δραστικότητα που εμφανίζουν και τα τρία ισοένζυμα με το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο, όπου κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με το FDNB και προσδίδει δράση υπεροξειδάσης στα συγκεκριμένα ένζυμα.

Μελετήθηκε η θερμοδυναμική συμπεριφορά των ισοενζύμων που προέκυψαν καθώς και του άγριου τύπου και υπολογίστηκε το σημείο τήξεως. Παρατηρήθηκε πως μέσω του δεύτερου και του τρίτου κύκλου της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης αυξήθηκε το σημείο τήξεως των ενζύμων περίπου κατά 10 °C. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις *Arrhenius* και *Eyring* υπολογίστηκαν η *Ενέργεια Ενεργοποίησης* (Ea), η *Ενθαλπία* (ΔH) και η *Εντροπία* του συστήματος (ΔS). Επειδή η θερμοκρασία και το pH είναι δύο παράγοντες που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ενζυμική δραστικότητα μεταβάλλοντας τη στερεοδομή του ενζύμου, μελετήθηκαν αναλυτικά. Το shII5 φαίνεται να εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία τους 55 °C ενώ τα shII6 και shII7, δέκα βαθμούς υψηλότερη.

Επίσης, μελετήθηκε τι είδους μεταβολή επιφέρει στο φθορισμό του ισοενζύμου shII5 κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν. Παρατηρήθηκε πως σχεδόν όλα τα σύμπλοκα ενζύμου-φυτοπροστατευτικού προϊόντος μεταβάλλουν την καμπύλη θερμικής μετατόπισης του shII5, δηλαδή παρουσιάζουν ενίσχυση του φθορισμού. Όμως, το σύμπλοκο με το fluorodifen είναι το μοναδικό που παρουσιάζει το φαινόμενο της απόσβεσης, δηλαδή μείωση της έντασης του φθορισμού. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του fluorodifen στην αντίδραση τόσο αυξάνεται η απόσβεση που παρατηρείται και τόσο μετατοπίζεται η καμπύλη θερμικής μετατόπισης προς τα αριστερά, δηλαδή μειώνεται το σημείο τήξεως του συμπλόκου. Παρατηρήθηκε ότι η σχέση μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης του φθορισμού και της συγκέντρωσης του fluorodifen καθώς και η σχέση μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης του φθορισμού και του σημείου τήξεως που εμφανίζει κάθε καμπύλη παρουσιάζει γραμμική εξάρτηση, γεγονός που υποδηλώνει πως το φαινόμενο

παρουσιάζει κάποια βιολογική σημασία. Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε πιθανότατα να χρησιμοποιηθεί για την οπτική ανίχνευση φυτοφαρμάκων.

Μελετήθηκε η ισορροπία και η θερμική μετουσίωση των ισοενζύμων σε σχέση με το χρόνο και κατά πόσο η διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης (μg) επηρεάζει το σημείο τήξεως αυτών. Παρατηρήθηκε πως το σημείο τήξεως των ισοενζύμων δε μετατοπίζεται με την αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας στα ισοένζυμα. Το *GmGSTU4-4* φαίνεται πως επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με τα άλλα δύο ισοένζυμα. Μόλις 2,2 M ουρίας απαιτούνται για να επιφέρουν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου στο μισό της. Αντίθετα, τα άλλα δύο ισοένζυμα, *sh4* και *shII5*, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή στη συγκεκριμένη καταπόνηση. Πιο συγκεκριμένα, η ουρία φαίνεται να μην επηρεάζει το *sh4*, μέχρι τη συγκέντρωση 3,75 M. Η συγκέντρωση της ουρίας που επιφέρει 50 % μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου είναι τα 6,7 M ενώ για το *shII5* είναι τα 6,9 M.

Ακολούθησε σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του *shII5*. Μετά τη σάρωση φάνηκε ότι οι στρομπιλουρίνες αναστέλλουν πλήρως την ενζυμική δραστηριότητα του *shII5*. Έτσι, υπολογίστηκαν οι δείκτες ανασταλτικής ισχύος, όπου το *pyrachlostrobin* εμφάνισε τη μικρότερη τιμή. Παράλληλα, μελετήθηκε το είδος της αναστολής που επιφέρει το *pyrachlostrobin* στο ένζυμο μέσω κινητικής μελέτης, όπου φαίνεται να εμφανίζει μικτού τύπου αναστολή έχοντας ως μεταβαλλόμενα υποστρώματα τόσο το CDNB όσο και τη GSH.

Τέλος, βασιζόμενοι στην αναστολή που παρουσιάζει το *shII5* έναντι του *pyrachlostrobin* αναπτύχθηκε βιοασθητήρας ανίχνευσής του σε περιβαλλοντικά δείγματα. Αρχικά το ένζυμο ακινητοποιήθηκε και πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για το σύστημα GSH/CDNB. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η K_m και ως προς τα δύο υποστρώματα έχει αυξηθεί σε σχέση με το ελεύθερο ισοένζυμο. Υπολογίστηκε ο δείκτης IC_{50} για το *pyrachlostrobin* με το ακινητοποιημένο ισοένζυμο και παρατηρήθηκε πως έχει μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, περίπου τρεις φορές υψηλότερη. Τα αποτελέσματα των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων χρησιμοποιώντας το ακινητοποιημένο ένζυμο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin* έδειξαν ότι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του *pyrachlostrobin* και της παραμένουσας δραστηριότητας φαίνεται να

είναι γραμμική, για το συγκεκριμένο εύρος τιμών, με $R^2 = 99,5 \%$. Επίσης, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων που έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η ευαισθησία, της μεθόδου που αναπτύχθηκε, βασίζεται στην ικανότητα που έχει το *pyrachlostrobin* να αναστέλλει ολοκληρωτικά τη ενζυμική δραστηριότητα του shP5. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου μελετήθηκε και με πειράματα ανάκτησης, επιβαρυνόμενα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις του *pyrachlostrobin*. Η ανάκτηση για τα δείγματα εμφιαλωμένου νερού και *pyrachlostrobin* κυμάνθηκε από 97,8 – 101,4 % και για το νερό δικτύου 98,0 – 101,2 %.

Στην επόμενη ενότητα της διατριβής, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* από *Glycine max* κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και εκφράστηκε σε *E. coli*. Επίσης, κλωνοποιημένα GST ισοένζυμα από *Phaseolus vulgaris* (*PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*) εκφράστηκαν σε *E. Coli*, καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Πραγματοποιήθηκε μελέτη εκλεκτικότητας των παραπάνω ισοενζύμων έναντι πιθανών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων και παρατηρήθηκε πως τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* καταλύουν μια πληθώρα αντιδράσεων σε αντίθεση με το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* όπου εμφανίζει περιορισμένη εκλεκτικότητα.

Ακολούθησε κινητική ανάλυση για το σύστημα GSH/CDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές για τα παραπάνω ισοένζυμα. Όσον αφορά στο CDNB τα ισοένζυμα εμφανίζουν σχετικά παρόμοια K_m ενώ έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH η K_m για το *GmGSTU5-5* είναι πολύ μικρή. Επίσης, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το σύστημα GSH/BDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές για τα *PvGSTUs*. Τέλος, επειδή το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εμφάνισε αξιοσημείωτη δραστηριότητα με το $CuOOH$, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση.

Μελετήθηκε η εκλεκτικότητα του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* ως προς ανάλογα GSH για να διαπιστωθεί εάν παρουσιάζει δράση με αυτά. Επιπλέον, εξετάστηκε η θερμική σταθερότητα των *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* καθώς και η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης έναντι της θερμοκρασίας.

Στην τελευταία ενότητα μελετήθηκαν GSTs που προέρχονται από ζωικό οργανισμό (*Mus musculus*). Πιο συγκεκριμένα, δείγματα RNA από *Mus musculus* μετατράπηκαν σε cDNA και χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την ενίσχυση των γονιδίων *MmGSTA1-*

1 και *MmGSTP1-1*. Τα ισοένζυμα, κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν ετερόλογα σε *E. coli*, καθαρίστηκαν και μελετήθηκε η εκλεκτικότητά τους ως προς τα διάφορα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Παρατηρήθηκε πως παρόλο που καταλύουν περίπου τον ίδιο αριθμό υποστρωμάτων, παρουσιάζουν διαφορετική εκλεκτικότητα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση, για τα υποστρώματα GSH και CDNB και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές.

Τέλος, λύθηκε η κρυσταλλοδομή του ισοενζύμου *MmGSTP1-1*, με χρήση περίθλασης ακτίνων X, με ανάλυση 1,28 Å. Το ισοένζυμο *MmGSTP1-1* κρυσταλλώθηκε ως διμερές και στην κάθε υπομονάδα υπάρχει ένα μόριο S-(4-νιτροβένζυλο)-GSH δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο. Οι δύο υπομονάδες σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα. Κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης παρατηρήθηκε πως στη δομή του ενζύμου διατηρήθηκαν κάποια ιόντα Ca^{+2} που δημιουργούν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη δέσμευση του υποστρώματος, στη σύνδεση ασβεστίου και στην κατάλυση είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ διαφόρων ισοενζύμων της *mi* τάξης και του *MmGSTP1-1* και έδειξαν ότι υπάρχει εξαιρετικά υψηλός βαθμός ομολογίας.

*Protein engineering of the enzyme glutathione transferase to modify
its catalytic and structural properties*

Abstract

Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.8), are a large superfamily of enzymes involved in the metabolism of xenobiotic compounds. GSTs catalyze the nucleophilic conjugation of the reduced glutathione (GSH) to a wide variety of electrophilic, hydrophobic and cytotoxic substrates. The reaction product is excreted from the cell, providing a defensive mechanism against the harmful effects of toxic compounds and oxidative stress.

In the first part of the thesis, a library of chimeric GSTs created by DNA shuffling of the tau class GSTs from *Glycine max* (*GmGST2*, *GmGST8-8* and *GmGST10-10*) were screened using the GSH/alachlor system. Three colonies namely sh4, sh15 and sh19, were selected and cloned into the pETite™ plasmid vector, expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Steady-state kinetic analysis were performed to characterize the mutant enzymes. Next, the substrate specificity of the mutant enzymes was evaluated using a wide range of different electrophilic substrates. The results suggested that the mutant enzymes exhibit wider substrate specificity, compared to the wild-type enzyme. In addition, the three-dimensional structure of sh4 in complex with GSH was determined, using the hanging drop evaporation method, at 2.27 Å resolution.

The library of the chimeric GSTs was further screened towards thermostability. Three colonies, namely shII5, shII6 and shII7, which showed high stability and enzymatic activity, were selected for further characterization. The results showed that the melting point of the enzymes was increased by about 10 °C. The effect of temperature and pH on enzyme activity and stability were investigated and the thermodynamic parameters [activation energy (E_a), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS)] were measured. In addition, fluorescence spectroscopy and thermal shift assay were used to characterize the structural and binding properties of the shII5 enzyme.

The inhibition of shII5 isoenzyme towards a wide range of pesticides and herbicides was evaluated. The results showed that strobilurins, are strong inhibitors for the enzyme. The IC_{50} values were calculated and *pyrachlostrobin* proved to be the strongest inhibitor. In addition, kinetic inhibition studies revealed that *pyrachlostrobin* appeared

to bind at the substrate-binding region in a mixed manner with respect to both substrates, CDNB and GSH. The ability of *pyrachlostrobin* to inhibit the activity of shII5 enzyme, was exploited for the development of a biosensor for the determination of *pyrachlostrobin* in water samples. The enzyme was immobilized using glutaraldehyde chemistry in the presence of BSA. The correlation between the different concentrations of *pyrachlostrobin* and the enzyme activity proved to be linear in a specific range, with correlation coefficient of 99.5%. The repeatability, sensitivity and durability of the GST-biosensor were statistically analysed. Reference curves were determined using distilled water, drinking water as well as mineral water.

In the next part of the thesis, the catalytic diversity of GST isoenzymes from plant and animal sources was investigated. A GST isoenzyme derived from *Glycine max* (*GmGSTU5-5*) was cloned, expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Also, two GST isoenzymes derived from *Phaseolus vulgaris* (*PvGSTU8.1* and *PvGSTU8.2*) were expressed in *E. coli*, purified by affinity chromatography and characterized. The results suggested that the *PvGSTU8.1* and *PvGSTU8.2* isoenzymes exhibit restricted substrate specificity compared to the *GmGSTU5-5* isoenzyme. Steady-state kinetic analysis, using was performed to determine the kinetic parameters (K_m , k_{cat}) towards a range of different electrophile substrates as well as GSH analogues. Two GST isoenzymes (*MmGSTA1-1* and *MmGSTP1-1*) from *Mus musculus* were investigated. The cDNA of the enzymes was isolated using RT-PCR, cloned, expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Steady-state kinetic analysis, using was performed to determine the kinetic parameters (K_m , k_{cat}) towards a range of different electrophile substrates. Moreover, the three-dimensional structure of *MmGSTP1-1* isoenzyme in complex with S-(4-nitrobenzyl)-GSH was determined, using the hanging drop evaporation method, at 1.28 Å resolution. The *MmGSTP1-1* isoenzyme was crystallized as a dimer. In each subunit, a molecule of S-(4-nitrobenzyl)-GSH was bound in the active site. The results showed that the amino acids involved in substrate binding and catalysis are highly conserved among *Mu* class isoenzymes.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

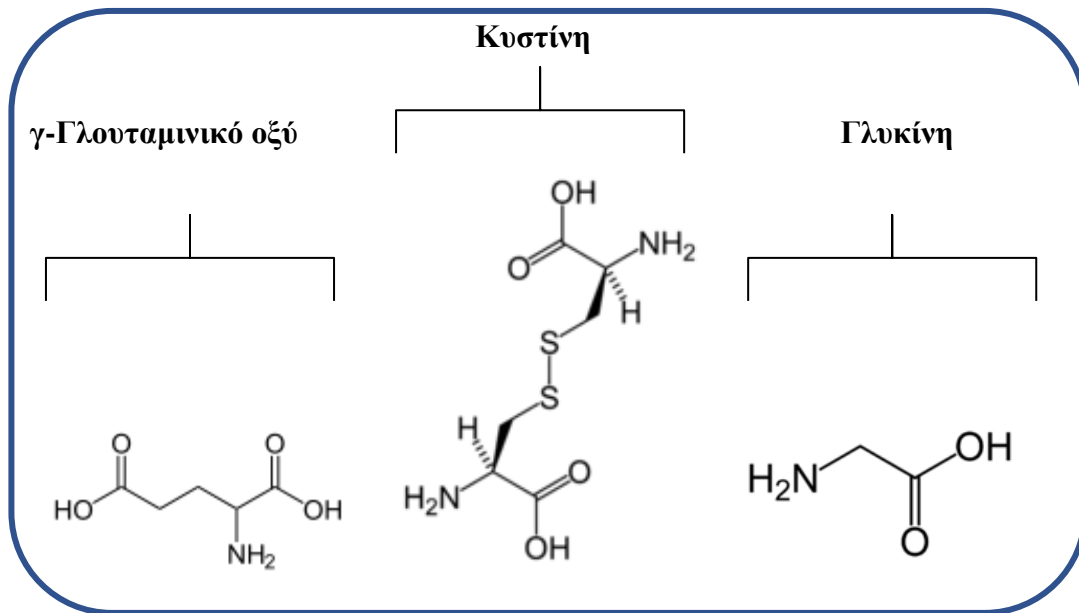
1.1 Ένζυμα και πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν μια κατηγορία βιομορίων με τεράστια σημασία για τη χημεία της ζωής. Οι μακρομοριακές αυτές ενώσεις επιτελούν σημαντικότερες λειτουργίες. Μερικές από αυτές είναι η χρήση τους ως δομικά συστατικά κυττάρων και ιστών, για αποθηκευτικούς σκοπούς, για μεταφορά άλλων ουσιών, για σκοπούς επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων, για την άμυνα κατά ξένων ουσιών και για τον έλεγχο των αντιδράσεων (ένζυμα) (Alberts, 2009; Taylor and Vaisman, 2010). Οι πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες στη θερμοκρασία και συνηθέστερα αποδιατάσσονται περίπου στους 40 °C (Jaenicke, 2000; Kumar and Nussinon, 2001).

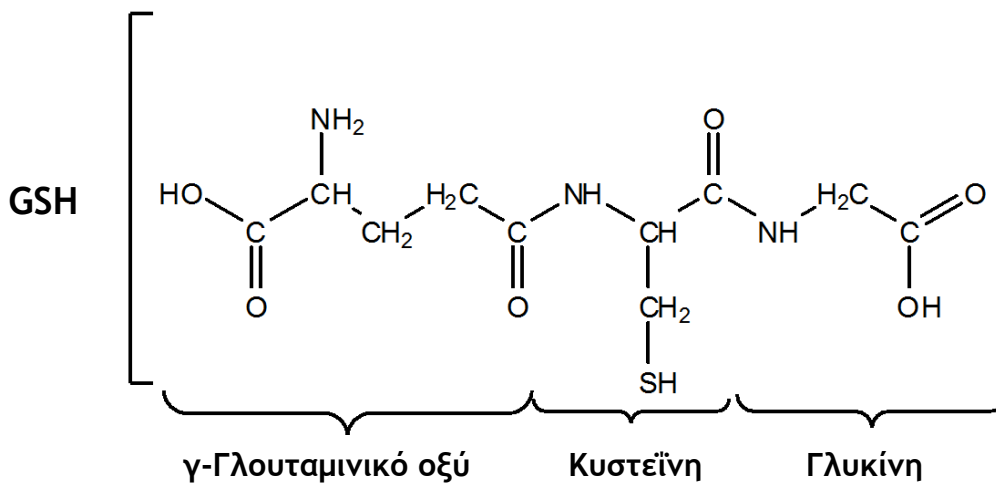
Τα ένζυμα αποτελούν ιδιαίτερης σημασίας κατηγορία πρωτεϊνών. Η κατηγορία αυτή διαφοροποιείται από άλλες πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες (όπως δομική λειτουργία, λειτουργία πρόσδεσης ή μεταφοράς) ως προς τις δομικές και δυναμικές ιδιότητές τους. Πολλά δομικά τους χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην καταλυτική δύναμη των ενζύμων όπως το ότι κρατάνε τις αντιδρούσες ομάδες σε προσανατολισμό που είναι ευνοϊκός για την αντίδραση, κ.ά.

1.2 Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) ή άλλως L-γ-γλουταμυλο-L-κυστεϊνυλο-γλυκίνη, η οποία είναι ένα α-αμινοξύ, αποτελεί την κύρια μοριακή θειόλη και το πιο άφθονο, χαμηλού μοριακού βάρους, πεπτίδιο που έχει βρεθεί σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, σε αερόβια και αναερόβια βακτήρια (Rouhier *et al.*, 2008; Kalinina *et al.*, 2014). Αποτελείται, με σειρά, από L-γλουταμινικό οξύ συνδεδεμένο, μέσω του γ-COOH του, στην αμινομάδα της L-κυστεΐνης και αυτή σε μία γλυκίνη (Σχήμα 1.1, 1.2).



Σχήμα 1.1: Τα τρία αμινοξέα που δομούν τη γλουταθειόνη.



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

Η γλουταθειόνη εναλλάσσεται μεταξύ μιας ανηγμένης θειολομορφής (GSH) και μιας οξειδωμένης μορφής (GSSG) (Σχήμα 1.3) (Pakfetrat *et al.*, 2017). Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GS-SG (οξειδωμένη μορφή) προκύπτει ύστερα από οξείδωση δύο μορίων ανηγμένης GSH και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας. Επίσης, το μόριο της GSH μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως η ελεύθερη κυστεΐνη, το συνένζυμο A και άλλες θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (Wang *et al.*, 2015).

Η GSH εξελίχθηκε ως ένα μόριο που προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωση. Συμμετέχει σε μια πληθώρα σημαντικών λειτουργιών στον μεταβολισμό, την κατάλυση και τη μεταφορά. Η δράση του ενζύμου αναγωγή του δισουλφιδίου της GSH (αναγωγή GSSG, EC 1.6.4.2) ευνοεί σε μεγάλο βαθμό το σχηματισμό της GSH. Είναι αξιοσημείωτο ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της GSH που υπάρχει στα κύτταρα βρίσκεται σε μορφή θειόλης. Η GSH λειτουργεί επίσης ως μέσο αποθήκευσης και μεταφοράς μορίων κυστεΐνης. Συντίθεται εντός των κυττάρων και τυπικά εξάγεται από αυτά. (Cai *et al.*, 2013; Kalinina *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

1.2.1 Δομικά στοιχεία και κατανομή της GSH

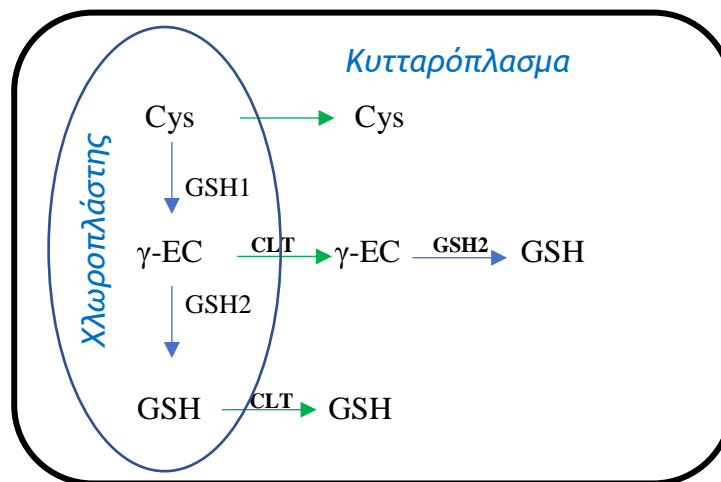
Η GSH είναι μία από τις κύριες χαμηλού μοριακού βάρους ενδοκυτταρικές ενώσεις που περιέχουν Cys και συντίθεται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Kalinina *et al.*, 2014). Η κυρίαρχη μορφή είναι η ανηγμένη και αντιπροσωπεύει πάνω από 98 % του συνόλου της GSH (Forman *et al.*, 2009). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το 80-85 % της κυτταρικής GSH βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, το 10-15 % στα μιτοχόνδρια και ένα μικρό ποσοστό βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Yuan *et al.*, 2009).

Η δομή της GSH είναι μοναδική, συνδέοντας το γλουταμινικό οξύ (Glu) με την κυστεΐνη (Cys) της GSH μέσω του γ-καρβοξυλίου του γλουταμικού αντί του α-καρβοξυλίου. Το μόνο ένζυμο που μπορεί να υδρολύσει αυτόν τον ασυνήθιστο δεσμό είναι η γ-γλουταμυλτρανσπεπτιδάση (GGT), η οποία υπάρχει μόνο στην εξωτερική επιφάνεια ορισμένων κυτταρικών τύπων (Kuenzly *et al.*, 2017; Goncalves *et al.*, 2017). Κατά συνέπεια, η GSH είναι ιδιαιτέρως ανθεκτική στην ενδοκυτταρική αποικοδόμηση και μεταβολίζεται μόνο από κύτταρα που εκφράζουν την GGT. Εξαιτίας της δομής και της υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσής της (1-10 mM; 10 mM σε ηπατικά και κακοήθη κύτταρα), η GSH λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό και εμπλέκεται στη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγής, στο σύστημα αποτοξίνωσης, στη σύνθεση της εικοσανοειδούς μεμβράνης καθώς και στη ρύθμιση πολλών μηχανισμών κυτταρικής σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του κυττάρου κύκλου, της γονιδιακής έκφρασης και της απόπτωσης (Townsend *et al.*, 2003; Kalinina *et al.*, 2014).

1.2.2 Σύνθεση του τριπεπτιδίου της GSH

Η GSH, ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γ -Glu-Cys-Gly, συντίθεται σε μια αντίδραση δύο βημάτων εξαρτώμενη από τα προαναφερθέντα αμινοξέα. Αρχικά, το Glu και η Cys συνδέονται για την παραγωγή γ -γλουταμυλκυστεΐνης (γ -EC), η οποία καταλύεται από τη συνθετάση γ -EC (Lu, 2013). Έπειτα, η Gly ενσωματώνεται στο καρβοξυτελικό άκρο για να δημιουργηθεί η GSH, η οποία καταλύεται από τη συνθετάση της GSH (Wang and Oliver 1996; Kalinina *et al.*, 2014). Στα φυτά, η συνθετάση του γ -EC και η συνθετάση της GSH κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο, GSH1 (May and Leaver 1994) και GSH2 (Wang and Oliver 1996), αντίστοιχα (Σχήμα 1.3).

Η Cys συντίθεται όχι μόνο στους χλωροπλάστες αλλά επίσης στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, ενώ η σύνθεση του γ -EC από Glu και Cys περιορίζεται στους χλωροπλάστες. Σε αντίθεση με τη σύνθεση του γ -EC, η σύνθεση της GSH από το γ -EC και τη Gly λαμβάνει χώρα τόσο χλωροπλάστες όσο και στο κυτταρόπλασμα (Makashita-Maruyama and Ohkama-Ohtsu, 2017; Sabetta *et al.*, 2017).



Σχήμα 1.3: Σύνθεση της GSH, όπου GSH1: συνθετάση της γ -γλουταμυλκυστεΐνης, GSH2: συνθετάση της GSH, γ -EC: γ -γλουταμυλκυστεΐνη, CTL: μεταφορέας.

1.2.3 Οξειδοαναγωγική και αντιοξειδωτική λειτουργία της GSH

Η αντιοξειδωτική λειτουργία της GSH επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό από την υπεροξειδάση της GSH (GPx). Οι αντιδράσεις που καταλύει μειώνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς η GSH οξειδώνεται σε GSSG. Η GSSG με τη σειρά της,

μετατρέπεται πάλι σε GSH με την αναγωγή της GSSG εκλύοντας NADPH, σχηματίζοντας έναν κύκλο οξειδοαναγωγής (Lu *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2012). Η καταλάση μπορεί, επίσης, να οξειδώσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά υπάρχει μόνο στα υπεροξισώματα. Αυτό καθιστά ιδιαίτερος σημαντική τη GSH στα μιτοχόνδρια, για την προάσπισή τους υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες καταπόνησης, δημιουργούμενες από οξειδωτικό στρες (Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006; Kalinina *et al.*, 2014). Καθώς ο λόγος της GSH προς τη GSSG καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ενδοκυτταρικό δυναμικό οξειδοαναγωγής (Forman *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013), για να αποφευχθεί μια σημαντική μετατόπιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, μειώνεται η GSSG σε GSH. Η GSSG μπορεί να εξαχθεί από το κύτταρο ή να αντιδράσει με την ομάδα σουλφυδρυλίου της πρωτεΐνης που οδηγεί στο σχηματισμό του δισουλφιδίου. Έτσι, το σοβαρό οξειδωτικό στρες απαλείφει την κυτταρική GSH (Lu *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Espinosa-Díez *et al.*, 2018).

Μια άλλη λειτουργία της GSH ρυθμίζει την οξειδοαναγωγική κυτταρική σηματοδότηση. Αυτό επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με την τροποποίηση της οξειδωτικής κατάστασης των κρίσιμων υπολειμμάτων κυστεΐνης της πρωτεΐνης (Lu *et al.*, 2009; Dalle-Donne *et al.*, 2009; Garcia-Jimenez *et al.*, 2014). Η GSH μπορεί να συνδεθεί αναστρέψιμα με το -SH της πρωτεΐνης (Prot-SH) με μια διαδικασία που ονομάζεται γλουταθειονυλίωση, δημιουργώντας γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες (Prot-SSG), οι οποίες μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν είτε να απενεργοποιήσουν την πρωτεΐνη (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Αυτός είναι ένας μηχανισμός προστασίας των ευαίσθητων θειολών της πρωτεΐνης από τη μη αναστρέψιμη οξείδωση και μπορεί επίσης να χρησιμεύσει για να αποτρέψει την απώλεια GSH υπό οξειδωτικές συνθήκες. Πολλοί παράγοντες μεταγραφής και μόρια σηματοδότησης έχουν κρίσιμα υπολείμματα κυστεΐνης που μπορούν να οξειδωθούν και το γεγονός αυτό αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό με τον οποίο οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS) ρυθμίζουν την πρωτεϊνική λειτουργία και την κυτταρική σηματοδότηση (Lu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2013; Garcia-Jimenez *et al.*, 2014).

1.3 Γενικά για τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (EC 2.5.1.18), που ονομάζονται επίσης και S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, είναι ένζυμα που καταλύουν τη νουκλεόφιλη προσβολή από την οξειδωμένη GSH σε μη πολικές ενώσεις που περιέχουν

ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα, αζώτου ή θείου. Τα υποστρώματά τους περιλαμβάνουν αλογονονιτροβενζόλια, οξείδια, κινόνες και α/β -ακόρεστα καρβονύλια (Sheedan *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2005). Στα βιολογικά συστήματα, η δραστηριότητα της GST είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς έχει εξελιχθεί μέσω συγκλινουσών οδών σε τουλάχιστον τέσσερις δομικά διακριτές οικογένειες ενζύμων. Αυτές είναι οι κυτταροπλασματικές GSTs, που ανακαλύφθηκαν πρώτες και έχουν μελετηθεί περισσότερο, οι μιτοχονδριακές της *kappa* τάξης, οι μεμβρανικές GSTs (MAPEG) και οι πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη, FosA και FosB (Dixon *et al.*, 2000; Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2005; Fedets *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Monticolo *et al.*, 2017).

Οι κυτταροπλασματικές GSTs αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια τέτοιων τρανσφερασών και έχουν δράσεις που είναι μοναδικές για αυτή την ομάδα ενζύμων. Καταλύουν την θειόλυση του οξικού 4-νιτροφαινυλίου, εμφανίζουν δράση θειολικής τρανσφεράσης, αντιδρούν με την τρινιτρογλυκερίνη και το μονομεθυλοσαρβονικό οξύ και καταλύουν τον ισομερισμό των β -5-3-κετοστεροειδών (Chen *et al.*, 2017; Monticolo *et al.*, 2017).

Οι GSTs παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη φαρμακολογία και την τοξικολογία επειδή παρέχουν στόχους για θεραπείες αντι-αγχωτικών και αντικαρκινικών φαρμάκων (Ruscue *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2014). Επίσης, μεταβολίζουν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και υποπροϊόντα του οξειδωτικού στρες. Η υπερέκφραση των GSTs σε καρκινικά κύτταρα θηλαστικών έχει συσχετιστεί με την αντίσταση σε διάφορους αντικαρκινικούς παράγοντες και χημικά (Hayes *et al.*, 2005). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα των GSTs έχουν συσχετιστεί με την ανοχή των εντομοκτόνων καθώς και με την εκλεκτικότητα των ζιζανιοκτόνων (Edwards *et al.*, 2004).

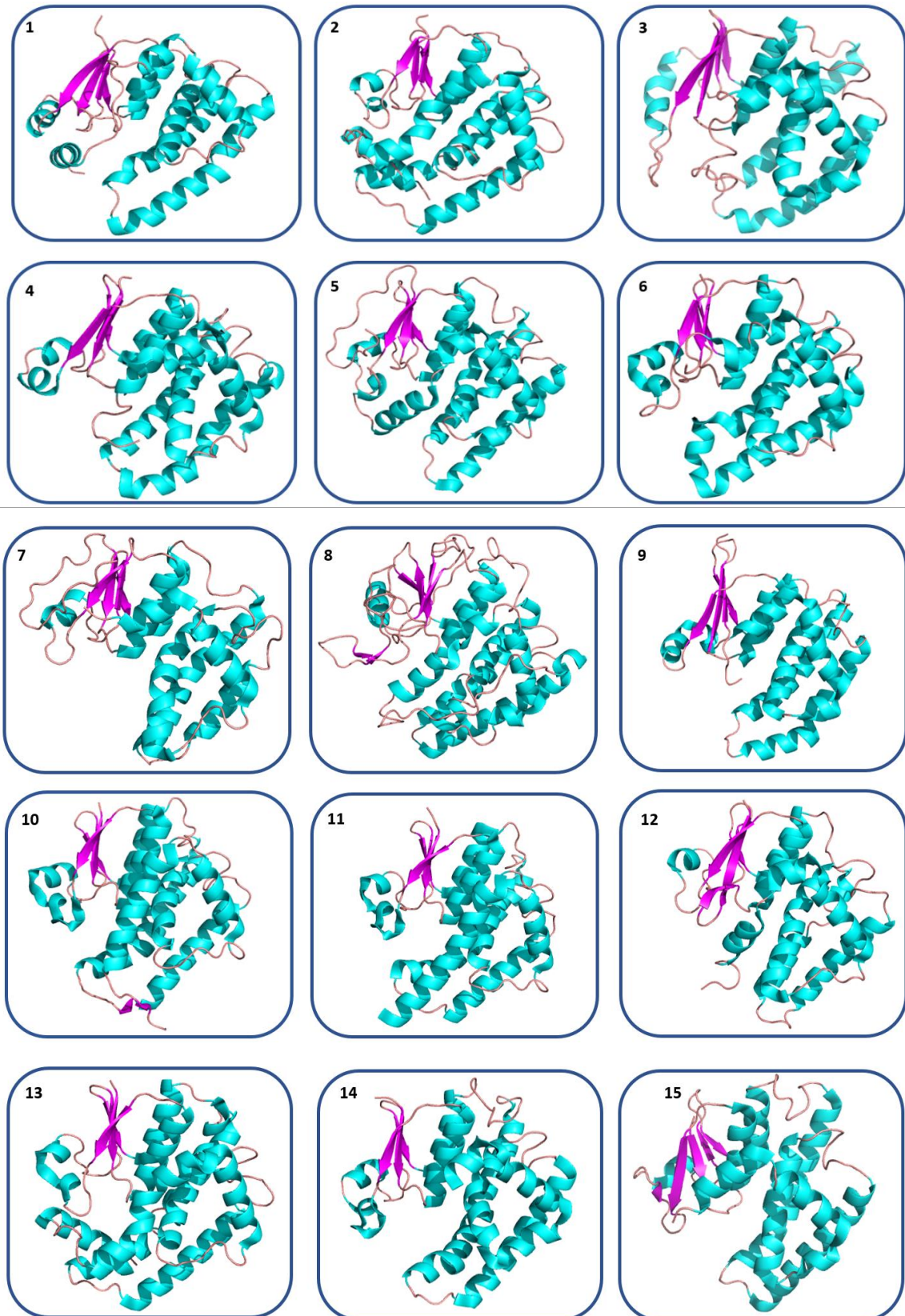
Στα μικρόβια, τα φυτά, τα ψάρια και τα θηλαστικά, η έκφραση των GSTs ρυθμίζεται από την έκθεσή τους σε προ-οξειδωτικούς παράγοντες (Veal *et al.*, 2002; Leirs *et al.*, 2003; An *et al.*, 2003; Allocati *et al.*, 2003). Αυξημένη δράση των GSTs παρατηρείται επίσης σε ζώα που πέφτουν σε χειμερία νάρκη (Desikan *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η επαγωγή των GSTs είναι μια εξελικτικά διατηρημένη απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες.

1.4 Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs

1.4.1 Κυτταροπλασματικές GSTs

Οι κυτταροπλασματικές GSTs αποτελούν τη μεγαλύτερη υπεροικογένεια διαλυτών ενζύμων, η οποία απαντά σε όλες τις κυτταρικές μορφές ζωής. Έχουν μελετηθεί εκτενώς στον άνθρωπο, στα φυτά, στα έντομα, στα μικροβιακά είδη καθώς και στους μύες (Board and Menon, 2013, 2016).

Με βάση την αμινοξική τους ακολουθία, οι κυτταροπλασματικές GSTs ταξινομούνται σε ένα μεγάλο αριθμό τάξεων ανά οργανισμό (Board and Menon, 2016). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί επτά τάξεις: α (A, alpha), μ (M, mu), π (P, pi), σ (sigma), θ (T, theta), ζ (Z, zeta) και ω (O, omega) (Board *et al.*, 2000, Hayes *et al.*, 2005). Επιπλέον τάξεις, εκτός των θηλαστικών, έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς. Στα έντομα έχουν βρεθεί οι τάξεις: δ (D, delta) και ε (E, epsilon) (Alias and Clark, 2007). Στα φυτά οι τάξεις: φ (F, phi), τ (T, tau), λ (L, lambda) και οι πρωτεΐνες με δράση διϋδροασκορβικής αναγωγής (DHAR) (Dixon *et al.*, 2002). Στα βακτήρια οι τάξεις: β (B, beta) (Allocati *et al.*, 2003) και χ (X, chi) (Pandey *et al.*, 2015). Στα φυτά, επίσης, έχουν βρεθεί και εκπρόσωποι των τάξεων θ και ζ (Edwards *et al.*, 2000, Dixon *et al.*, 2002b) που βρίσκονται στα ζώα, αλλά και στους μύκητες (Εικόνα 1.1). Τα μέλη της ίδιας τάξης παρουσιάζουν ομολογία ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία πάνω από 40 %, ενώ μεταξύ πρωτεϊνών διαφορετικών τάξεων η ομολογία είναι μικρότερη του 25 %. Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν τουλάχιστον 16 κυτταροπλασματικές GSTs. Δεδομένου ότι οι τάξεις *Alpha* και *Mu* μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή (Hayes *et al.*, 2005; Fedets *et al.*, 2014), μπορεί να δημιουργηθεί ένας σημαντικά μεγάλος αριθμός ισοενζύμων.

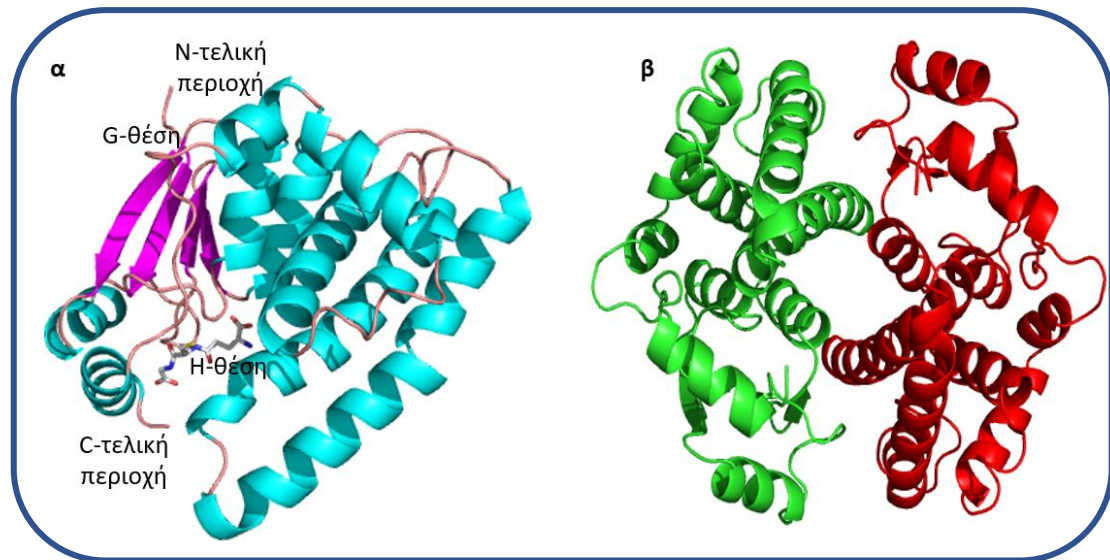


Εικόνα 1.1: Η κοινή δομή των υπομονάδων των GSTs. Οι κωδικοί PDB είναι οι ακόλουθοι: (1) alpha, 1gse; (2) theta, 1ljr; (3) mu, 1hna; (4) pi, 1glp; (5) omega, 1eem; (6) zeta, 1fw1; (7) lambda, 4pqh; (8) GHR, 4uss; (9) sigma, 2wb9; (10) delta, 4pnf; (11) epsilon, 2imi; (12) DHAR, 5el8; (13) tau, 4mpf; (14) phi, 5a4u; (15) beta, 1f2e. Οι απεικονίσεις των υπομονάδων δημιουργήθηκαν από το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Οι κυτταροπλασματικές GSTs των θηλαστικών παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη βιοϊατρική έρευνα λόγω των διαφορετικών ρόλων που διαδραματίζουν πολλά μέλη της οικογένειας σε φάρμακα και στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών ενώσεων. Πολυάριθμες μελέτες σε έντομα, φυτά και μικρόβια αναφέρουν ότι τα παραπάνω ένζυμα εμπλέκονται στη σύζευξη της GSH με μια μεγάλη σειρά από χημικές ουσίες. Εκτός από τις καταλυτικές αντιδράσεις σύζευξης, αναγωγής και ισομερισμού, οι κυτταροπλασματικές GSTs επίσης δεσμεύουν, ομοιοπολικά και μη, υδρόφοβες ενώσεις που δεν αποτελούν υποστρώματα (Fedets *et al.*, 2014; Board and Menon, 2016). Αυτή η λειτουργία συμβάλλει στην ενδοκυτταρική μεταφορά, απομόνωση και διάθεση ξеноβιοτικών ενώσεων και ορμονών. Τέτοιες ενώσεις αποτελούν τα αζωχρώματα, η χολερυθρίνη, η αίμη, τα στεροειδή και οι θυρεορρομόνες.

Οι κυτταροπλασματικές GSTs είναι ενεργές ως διμερείς πρωτεΐνες, είτε ομοδιμερείς (δύο ίδιες υπομονάδες) είτε ετεροδιμερείς (δυο διαφορετικές υπομονάδες) (Εικόνα 1.2.β) (Chronopoulou and Labrou, 2009; Perperopoulou *et al.*, 2014; Labrou *et al.*, 2015; Rouliou *et al.*, 2016). Όσον αφορά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων με σκοπό το σχηματισμό της τεταρτοταγούς δομής, περιλαμβάνονται οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδροφιλικές και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου τύπου 'κλειδιού-κλειδαριάς' που συγκρατεί τις υπομονάδες μαζί (Hegazy *et al.*, 2004; Fedets *et al.*, 2014). Σε κάθε δομική περιοχή διακρίνονται δύο θέσεις δέσμευσης, η συντηρημένη G-θέση που απαντά προς το N-τελικό άκρο και η H-θέση η οποία δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη και τοποθετείται προς το C-τελικό άκρο (Oakley, 2005; Axarli *et al.*, 2009; Fedets *et al.*, 2014; Labrou *et al.*, 2015). Η H-θέση παρουσιάζει μικρή ομολογία μεταξύ των ισοενζύμων μιας τάξης και αναγνωρίζει αρκετά υποστρώματα διαφορετικού μεγέθους, δομής και υδροφοβικότητας. Συνεπώς, η δομή της H-θέσης είναι αυτή που καθορίζει την εξειδίκευση που παρουσιάζει κάθε GST (Εικόνα 1.2.α).

Τα μέλη της υπεροικογένειας των κυτταροπλασματικών GSTs αυξάνονται με ταχείς ρυθμούς λόγω της συνεχούς αύξησης των γενετικών πληροφοριών (Fedets *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017).

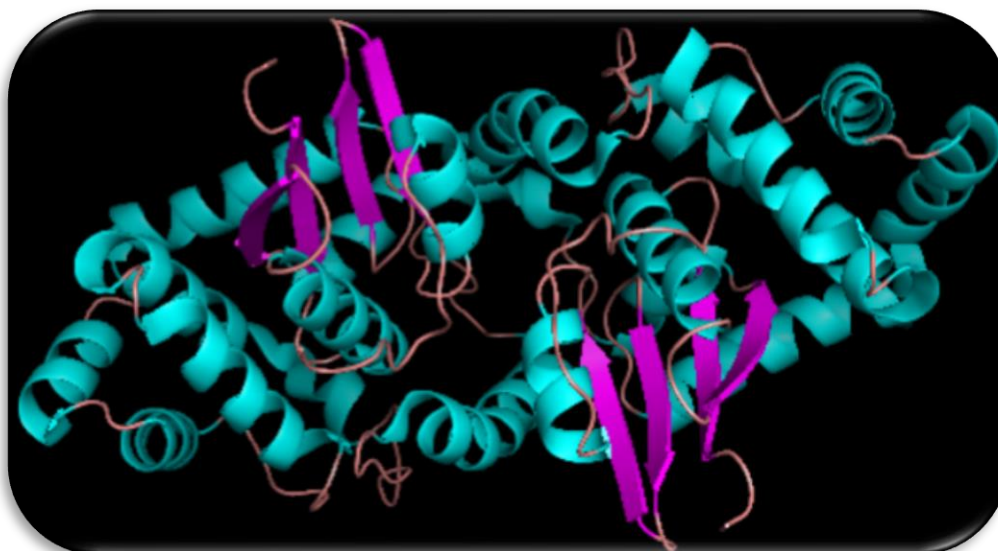


Εικόνα 1.2: (α) Δομή της υπομονάδας του ανθρώπινου ισοενζύμου hGSTA1-1 (pdb code: 1gse). Επισημαίνονται η G-θέση, η H-θέση, το N-τελικό και το C-τελικό άκρο. (β) Διαγραμματική απεικόνιση της ετεροδιμερούς πρωτεΐνης hGSTA1-1 (pdb code: 1gse). Η εικόνα δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα PyMOL (DeLano, 2002).

1.4.2 Μιτοχονδριακές GSTs

Η *kappa* τάξη των GSTs αποτελείται επίσης από διαλυτά ισοένζυμα. Παρουσιάζει κάποιες ιδιαιτερότητες όσον αφορά στα υποστρώματα που αναγνωρίζει και είναι παρόμοια με τις κυτταροπλασματικές GSTs και από πολλούς θεωρούνται ως μακρινά μέλη της ίδιας οικογένειας (Ataya *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2016). Φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι κατανέμονται ευρέως στη φύση, αλλά απουσιάζουν από τα έντομα.

Οι GSTs της *kappa* τάξης των μιτοχονδρίων των θηλαστικών είναι διμερή και αποτελούνται από υπομονάδες των 226 περίπου αμινοξέων. Το ποντίκι, ο αρουραίος και ο άνθρωπος διαθέτουν μόνο μία πρωτεΐνη της συγκεκριμένης τάξης (Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004) (Εικόνα 1.3). Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X έδωσε οριστικά στοιχεία ότι η συγκεκριμένη τάξη αντιπροσωπεύει έναν ξεχωριστό τύπο GST (Ataya *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015).



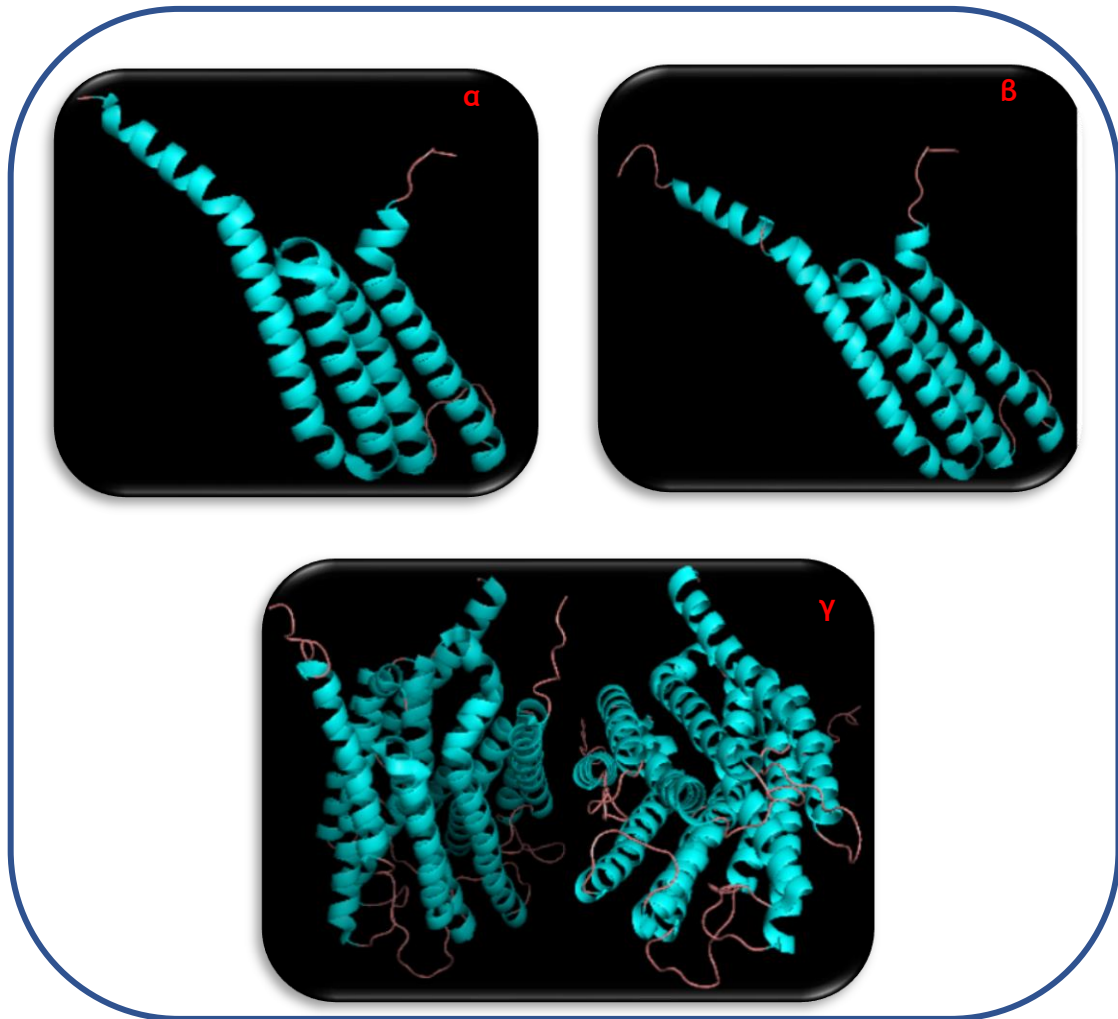
Εικόνα 1.3: Μιτοχονδριακή GST *kappa* τάξης (PDB κωδικός: 1r4w). Η εικόνα δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Η *kappa* τάξη των GSTs εμφανίζει υψηλή ειδική δραστηριότητα με τα αρυλαλογονίδια, όπως το CDNB (Shen *et al.*, 2015). Απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στο συκώτι, στο στόμαχο και στην καρδιά. Επίσης, φαίνεται να είναι πιο ομοιόμορφα εκφρασμένη στους ανθρώπινους ιστούς (Thomson *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004). Αν και αυτή η GST αρχικά απομονώθηκε από τα μιτοχόνδρια, δεν υπάρχει στο κυτταρόπλασμα. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι βρίσκεται και στα υπεροξυσώματα (Hayes *et al.*, 2005).

1.4.3 Μικροσωμικές GSTs

Η οικογένεια των μικροσωμικών GSTs/πρωτεΐνες MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism), συνδέονται με το μεταβολισμό των εικοσανοειδών (Εικόνα 1.4). Συνολικά έχουν περιγραφεί τέσσερις υποομάδες MAPEG (I-IV), με τις πρωτεΐνες εντός της ίδιας υποομάδας να μοιράζονται ομοιότητα > 20 %. Επίσης, έχουν αναγνωρισθεί έξι ανθρώπινες MAPEG πρωτεΐνες και αυτές κατηγοριοποιούνται στις υποομάδες I, II και IV (Pei *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Το πρώτο μέλος της οικογένειας MAPEG, MGST1, αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένα ένζυμο που μεταβολίζει το CDNB το οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί έπειτα από επεξεργασία με το N-αιθυλομαλεϊμίδιο (Hayes *et al.*, 2005; Jakobsson *et al.*, 2014). Οι υποομάδες της οικογένειας MAPEG είναι: η υποομάδα I που αποτελείται από τις FLAP, LTC₄S και MGST2 πρωτεΐνες. Το μόνο μέλος της υποομάδας II είναι η MGST3, ενώ τα MGST1 και PGES1 απαρτίζουν την υποομάδα IV. Η υποομάδα III περιέχει μικροσωμικές πρωτεΐνες τύπου GST από *Escherichia coli* και *Vibrio cholera*.

Ερευνητικά στοιχεία δείχνουν ότι η MGST1 λειτουργεί μόνο ως ένζυμο αποτοξίνωσης. Αντίθετα, η ανθρώπινη MGST2 μπορεί να αποτοξινώνει ξενοβιοτικές ενώσεις και να συνθέτει LTC₄ (Hayes *et al.*, 2005). Η FLAP δεν έχει καταλυτική δραστηριότητα αλλά δεσμεύει το αραχιδονικό οξύ και φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη σύνθεση όλων των λευκοτριενών.



Εικόνα 1.4: Απεικόνιση υπομονάδων MAPEG ισοενζύμων: (α) πρωτεΐνη MGST1 από αρουραίο (κωδικός pdb: 2H8A), (β) ανθρώπινη πρωτεΐνη LTC4S (κωδικός pdb: 2UUI), (γ) ανθρώπινη πρωτεΐνη FLAP (κωδικός pdb: 2Q7R). Η εικόνα δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

1.5 Η δομή των GSTs

Οι κρυσταλλικές δομές πάρα πολλών διαλυτών GSTs, συμπεριλαμβανομένων των κύριων κατηγοριών ανθρώπινων, φυτικών, ζωικών και βακτηριακών, έχουν επιλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των αλληλουχιών, οι τρισδιάστατες δομές των GSTs είναι εντυπωσιακά παρόμοιες. Η δομή αρκετών μελών των φυτικών GSTs (π.χ. τάξεις *tau*, *phi*, *zeta*,

lambda και *GHR*) έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η GST *phi* από *Arabidopsis thaliana* (Reinemer *et al.*, 1996, Thom *et al.*, 2001), η GST *tau* από σιτάρι (Thom *et al.*, 2002), από ρύζι (OsGSTU1) (Dixon *et al.*, 1998), από καλαμπόκι (Neuefeind *et al.*, 1997a,b) και από *Glycine max* (Axarli *et al.*, 2009). Επίσης, έχει χαρακτηριστεί η δομή ενός GST ισοενζύμου από το *Populus trichocarpa* που ανήκει στην οικογένεια *GHR* (Lallement *et al.*, 2015).

Οι GSTs λειτουργούν ως διμερή (Εικόνα 1.5), αποτελούμενα από δύο παρόμοιες ή διαφορετικές υπομονάδες και μέσο μήκος αλληλουχίας τα 200-250 (Axarli *et al.*, 2009; Mohsenzadeh *et al.*, 2011; Board and Menon, 2013; Chronopoulou *et al.*, 2014; Bathige *et al.*, 2015; Labrou *et al.*, 2015; Axarli *et al.*, 2016; Skopelitou *et al.*, 2015, 2017). Η ύπαρξη ενός μεγάλου βρόγχου, ποικίλου μεγέθους, μεταξύ των υπομονάδων είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό των GSTs. Οι μοναδικές GSTs που φαίνεται ότι μπορούν να λειτουργούν ως μονομερή είναι οι GSTLs και οι DHARs (Kumar *et al.*, 2012, Lallement *et al.*, 2014).



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση διμερούς πρωτεΐνης (pdb code: 2vo4). Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

Κάθε υπομονάδα των GSTs έχει τουλάχιστον δύο θέσεις δέσμευσης, τη G-θέση και την H-θέση (Board and Menon, 2013). Η G-θέση βρίσκεται στη N-τελική περιοχή και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη θειορεδοξίνη. Αποτελείται από β-ελάσματα (β 1,

$\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$), εκ των οποίων τα τρία είναι αντιπαράλληλα μεταξύ τους ($\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 3$) (Axarli *et al.*, 2009; Cummins *et al.*, 2011; Shaokui, 2012; Cho *et al.*, 2015; Labrou *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Αυτή η δομική περιοχή αποτελείται από β -ελάσματα τα οποία βρίσκονται ανάμεσα σε α -έλικες, με δομικό μοτίβο βαβαββα (Parbhoo, 2013) (Εικόνα 1.6).



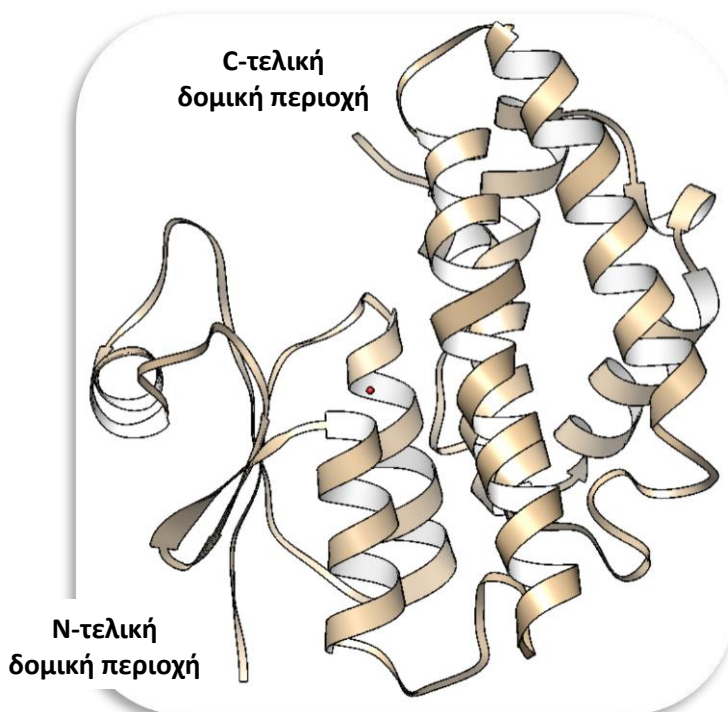
Εικόνα 1.6: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς του ισοενζύμου *GmGSTU4-4* (PDB code: 2no4). Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως κόκκινα βέλη και οι βρόγχοι ως μωβ καλώδια. Ως $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$ χαρακτηρίζονται τα β -ελάσματα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (DeLano, 2002).

Η N-τελική περιοχή αρχίζει με ένα β -έλασμα ($\beta 1$) και έπειτα ακολουθεί μια α -έλικα ($\alpha 1$). Μετά παρουσιάζεται ένας δεύτερο β -έλασμα ($\beta 2$), το οποίο είναι παράλληλο προς το έλασμα $\beta 1$. Ένας βρόχος οδηγεί σε μια δεύτερη α -έλικα ($\alpha 2$), η οποία ακολουθείται από δύο διαδοχικά β -ελάσματα ($\beta 3$ και $\beta 4$), τα οποία είναι αντιπαράλληλα και ακολουθούνται από μια τρίτη α -έλικα ($\alpha 3$). Ο βρόχος που συνδέει την $\alpha 2$ έλικα με το έλασμα $\beta 3$ διαθέτει ένα εξαιρετικά συντηρημένο κατάλοιπο προλίνης (*cis*-Pro βρόχος) που συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της πρωτεΐνης (Lallement *et al.*, 2015). Η $\alpha 2$ έλικα, παρέχει τρία διαφορετικά κατάλοιπα αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με τη Gly της GSH. Το τριπεπτίδιο της GSH δεσμεύεται αντιπαράλληλα με τον βρόχο που προηγείται του $\beta 3$ ελάσματος.

Η C-τελική περιοχή είναι εξ'ολοκλήρου ελικοειδής και σχηματίζεται από πέντε ή έξι α -έλικες (Sheehan *et al.*, 2001). Μερικές τάξεις των GSTs, όπως η *alpha*, η *omega*, η

tau και η *theta* μπορεί να έχουν μια επιπλέον α -έλικα. Η θέση πρόσδεσης για το ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα, η Η-θέση, είναι λιγότερο συντηρημένη και συμβάλλει στην ικανότητα των GSTs να επιδεικνύουν ευρεία εξειδίκευση ως προς τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Board and Menon, 2013; Jacquot *et al.*, 2013; Chronopoulou *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015) (Εικόνα 1.7).

Η Ν-τελική περιοχή έχει ένα κατάλοιπο, κρίσιμο για τη σύνδεσή της με τη GSH και την καταλυτική δραστηριότητα της GSH. Το συντηρημένο κατάλοιπο της Ser των τάξεων *theta*, *zeta*, *phi* και *tau* διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της GSH. Άλλες κλάσεις, όπως η GSTI, η GSTH, η DHAR, η GHR, η GSTL και η mPGES-2 έχουν ένα διατηρημένο κατάλοιπο Cys στο μοτίβο του ενεργού τους κέντρου και κατηγοριοποιούνται ως Cys-GSTs (Lallement *et al.*, 2014) (Πίνακας 1.1). Οι G και Η-θέσεις μπορούν να αλλάξουν διαμόρφωση για να φιλοξενήσουν μια ένωση, μέσω μηχανισμού επαγόμενης προσαρμογής (Axarli *et al.*, 2009a,b). Πολλές βιοχημικές και δομικές μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αυτού του μηχανισμού, όπως για παράδειγμα αυτές στον αραβόσιτο GSTF1 και στη σόγια GSTU4-4 (Axarli *et al.*, 2009a).



Εικόνα 1.7: Δομή της υπομονάδας του ισοενζύμου *GmGSTU4-4* (pdb code: 2vo4). Επισημαίνονται το Ν-τελικό και το C-τελικό άκρο. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

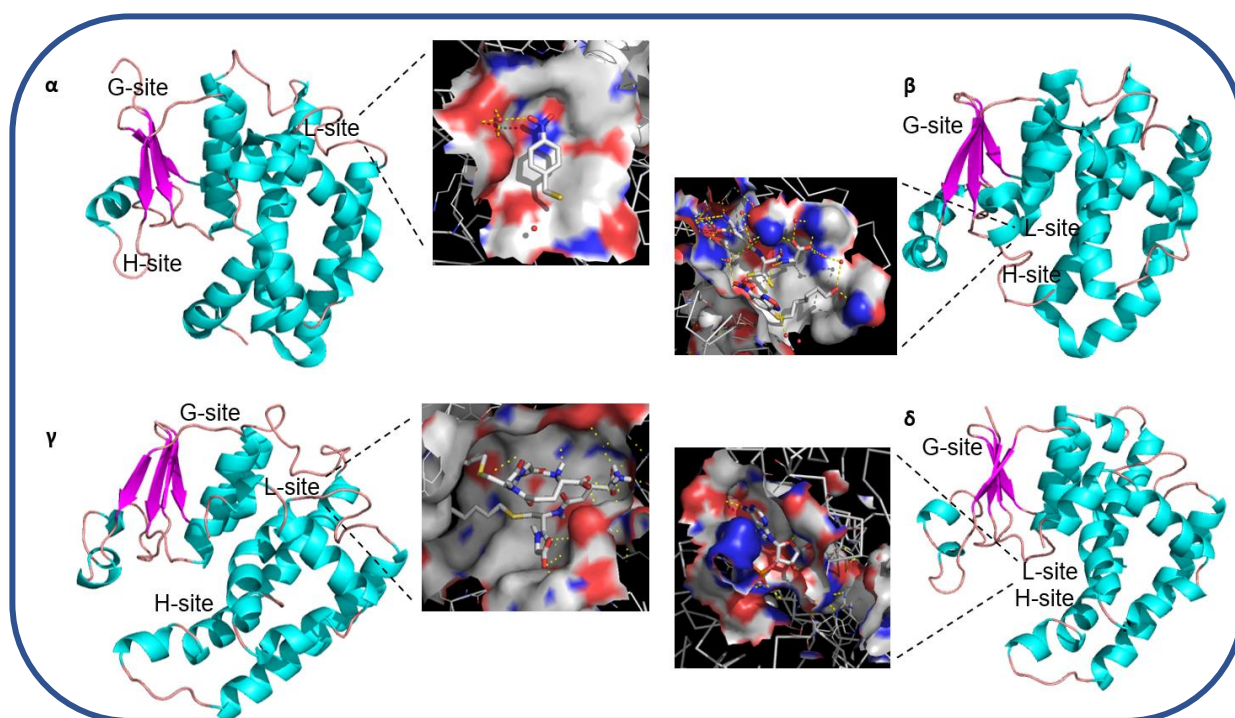
Πίνακας 1.1: Φυτικές GSTs και το ενεργό αμινοξικό τους κατάλοιπο.

Τάξεις	Κατάλοιπο	Τάξεις	Κατάλοιπο
Theta (T)	Ser	Metaxin	Άγνωστο
Zeta (Z)	Ser	TCHQD	Άγνωστο
Phi (F)	Ser	GSTH	Cys
Tau (U)	Ser	Iota (I)	Cys
Lambda (L)	Cys	GHR	Cys
EF1Bγ	Άγνωστο	Theta (T)	Ser
DHAR	Cys	mPGES2	Cys

Σε πολλές GSTs υπάρχει μια μη-καταλυτική θέση πρόσδεσης η οποία ονομάζεται L-θέση και είναι διαφορετική από τη G- και την H-θέση (Axarli *et al.*, 2004). Η ακριβής τοποθεσία αυτής της L-θέσης στις περισσότερες GSTs παραμένει ασαφής. Οι βιοφυσικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η L-θέση μπορεί να εντοπιστεί:

1. στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, δηλαδή στην περιφέρεια του διμερούς όπως στην περίπτωση της *GmGSTU4-4* (Axarli *et al.*, 2009c)
2. βαθιά στην ένωση των διμερών (Ahmad *et al.*, 2016)
3. ή να καταλαμβάνει μέρος της G και H-θέσης.

Για παράδειγμα, όσον αφορά στο ένζυμο *Arabidopsis thaliana*, έρευνα έδειξε ότι η L-θέση βρίσκεται δίπλα στη G-θέση ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των ελίκων $\alpha 2/\alpha 3$ και $\alpha 5$ (Reinemer *et al.*, 1996). Η L-θέση του ανθρώπινου GSTP1-1 ισοενζύμου επικαλύπτει την H-θέση. Η Axarli και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι η L-θέση δέσμευσης της GSTFI από *Zea mays* βρίσκεται κυρίως στη H-θέση. Πρόσφατα, διεξήχθη λεπτομερής μελέτη για τον χαρακτηρισμό της L-θέσης του ισοενζύμου GSTF2 από το *Arabidopsis thaliana* (Ahmad *et al.*, 2017). Με βάση την κρυσταλλογραφία ακτίνων X, φάνηκε η ικανότητα του *AtGSTF2* να σχηματίζει σύμπλοκα με την ινδολο-3-αλδεϋδη, την καμαλεξίνη, τα φλαβονοειδή και την κερσετίνη. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν δύο L-θέσεις, μία στην εξωτερική επιφάνεια του διμερούς και μια δεύτερη στον ενδιάμεσο χώρο των δύο υπομονάδων (Εικόνα 1.8). Η ινδολο-3-αλδεϋδη και η κερσετίνη βρέθηκαν να δεσμεύονται και στις δύο L-θέσεις, ωστόσο η καμαλεξίνη δεσμεύεται μόνο στην επιφανειακή θέση.



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας της L-θέσης τεσσάρων κρυσταλλογραφημένων δομών. Με μωβ απεικονίζονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες και με γαλάζιο οι α-έλικες. Οι αναστολείς καθώς και τα αμινοξέα που συνεισφέρουν στους δεσμούς με την L-θέση συμβολίζονται με ράβδους. (A) *GmGSTU4-4*, PDB code: 2vo4 (B) Human GSTP1-1, PDB code: 3gss. (C) *Arabidopsis thaliana*, PDB code: 1gnw. (D) *Zea mays*, PDB code: 1axd. Η εικόνα δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

1.6 Λειτουργίες των GSTs

Οι GSTs εξυπηρετούν διάφορες ζωτικές λειτουργίες, όπως η αντιοξειδωτική άμυνα, η αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών και των μεταβολιτών τους, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση, η συντήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και η διαμόρφωση της ανοσολογικής λειτουργίας (Ballatori *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009; Pallardo *et al.*, 2009; Liu, 2010) (Πίνακας 1.2).

1.6.1 Καταλυτικές λειτουργίες των GSTs εξαρτώμενες από τη GSH

Το άτομο θείου της GSH θεωρείται νουκλεόφιλο και ως εκ τούτου προτιμά το ηλεκτρονιόφιλο, ώστε να σχηματιστεί σύζευξη. Ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας του επιτρέπει τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονιόφιλα κέντρα και στις περισσότερες περιπτώσεις το θειολικό ανιόν (S^-) και το ηλεκτρονιόφιλο μόριο μοιράζονται ένα ζεύγος ηλεκτρονίων (Ivansson and Mannervik, 2007). Κατά συνέπεια, οι αντιδράσεις σύζευξης της GSH μπορούν να ομαδοποιηθούν ως αντιδράσεις υποκατάστασης και προσθήκης (Chronopoulou *et al.*, 2015). Στις αντιδράσεις υποκατάστασης, η αντικατάσταση της ομάδας του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος επιτυγχάνεται με το

θειολικό ανιόν της GSH (Ivarsson *et al.*, 2007). Η πλειονότητα των ζιζανιοκτόνων αποτοξινώνεται μέσω αντιδράσεων υποκατάστασης και πιο σπάνια με αντιδράσεις προσθήκης (Cummins *et al.*, 2011). Σε πολλές αντιδράσεις, το άτομο θείου της GSH αντιδρά με το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα (C-C) ή με έναν δακτύλιο οξιράνης (Ivarsson *et al.*, 2007).

Οι GSTs διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση ζιζανιοκτόνων. Η *phi* και *tau* τάξη των GSTs είναι σε θέση να δημιουργήσουν σύμπλοκο με τη GSH με έναν μεγάλο αριθμό ηλεκτρονιόφιλων ζιζανιοκτόνων όπως οι τριαζίνες, τα θειοκαρβαμικά, τα χλωροακετανιλίδια και οι διφαινυλαιθέρες.

Οι φυτικές GSTs, επίσης, παρουσιάζουν δράση υπεροξειδάσης. Καταλύουν την αναγωγή υδροϋπεροξειδίων σε αλκοόλες οι οποίες είναι λιγότερο τοξικές. Τα υδροϋπεροξειδία σχηματίζονται από την οξειδωτική βλάβη των μεμβρανικών λιπαρών οξέων (Attacha *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017). Τα μέλη των τάξεων *theta*, *phi* και *tau* εμφανίζουν υψηλή δράση υπεροξειδάσης, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων (Dixon *et al.*, 2009, Cummins *et al.*, 2011). Οι GSTs λειτουργούν επίσης ως ρεδοκτάσες γλουταθειονυλδροκινόνης (GS-HQR), ανάγοντας την GS-τριχλωρο-υδροκινόνη σε τριχλωρο-υδροκινόνη (Belchik and Xun, 2011, Lam *et al.*, 2012).

Μια άλλη, παρόμοια, δράση των GSTs είναι αυτή της διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης (DHAR), όπου χρησιμοποιείται η GSH για τη μετατροπή του διϋδροασκορβικού σε ασκορβικό, παράγοντας δισουλφίδιο της GSH ως παραπροϊόν (Dixon *et al.*, 2002a). Τα DHAR-GSTs παίζουν, επίσης, ουσιαστικό ρόλο στον κύκλο της GSH και του ασκορβικού οξέος, όπου η ανηγμένη μορφή του ασκορβικού οξέος είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό.

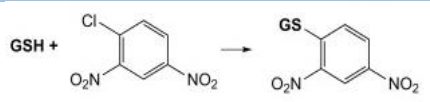
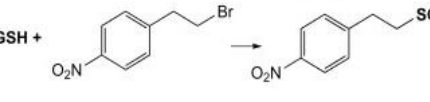
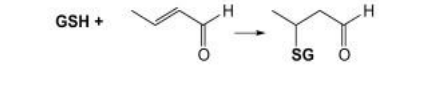
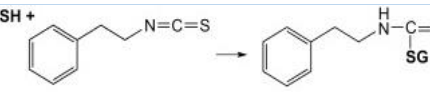
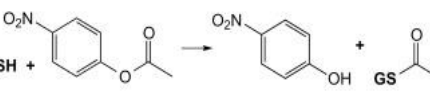
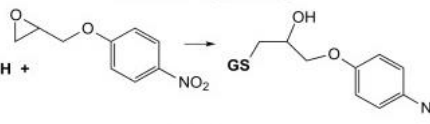
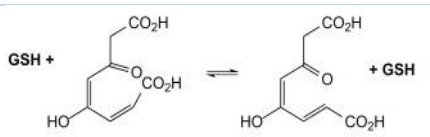
Επιπλέον, ένας άλλος ρόλος των GSTs είναι ο μεταβολισμός των φυσικών προϊόντων. Οι GSTs συμμετέχουν στο δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών (Moon, 2005, Cummins *et al.*, 2011). Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχουν αρκετές βιοχημικές λεπτομέρειες για την εμπλοκή των GSTs στο δευτερογενή μεταβολισμό, ωστόσο έχουν προταθεί ορισμένοι ρόλοι, όπως είναι η αναστρέψιμη S-γλουταθειονυλίωση, η S-γλουταθειονυλίωση για την προσθήκη θείου σε μεταβολίτες, η συμμεταφορά

μεταβολιτών και GSH (π.χ. ανθοκυανίνες) και η παροδική σύζευξη όπως στην περίπτωση αντιδράσεων ισομερισμού.

1.6.2 Μη καταλυτικές λειτουργίες των GSTs

Εκτός από την καταλυτική τους λειτουργία, οι GSTs εμφανίζουν μια μη καταλυτική λειτουργία (λειτουργία δέσμησης) και είναι σε θέση να δεσμεύουν ισχυρά ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, φλαβονοειδών, ανθοκυανινών, ορμονών (αυξίνη και κυτοκίνη), πορφυρογόνων και άλλων μεταβολιτών (Dixon *et al.*, 2008, 2010). Η δέσμηση τέτοιων ενώσεων επιτυγχάνεται στην L-θέση δέσμησης που βρίσκεται σε μια ξεχωριστή περιοχή της πρωτεΐνης ή επικαλύπτεται από την G- και την H-θέση. Πιθανότατα ο κεντρικός ρόλος αυτής της θέσης δέσμησης να είναι και η διευκόλυνση της μεταφοράς μεταβολιτών μεταξύ κυτταρικών διαμερισμάτων ή αποθήκευσής τους (Cummins *et al.*, 2011, Lallement *et al.*, 2014).

Πίνακας 1.2: Αντιδράσεις που καταλύουν οι GSTs

<i>Αντιδράσεις όπου η GSH καταναλώνεται</i>	
Νουκλεόφιλη αρωματική υποκατάσταση	
Νουκλεόφιλη αρωματική υποκατάσταση	
Προσθήκη	
Νουκλεόφιλη Προσθήκη	
Θειόλυση	
Διάνοιξη του εποξειδικού δακτυλίου	
<i>Αντιδράσεις όπου η GSH δεν καταναλώνεται</i>	
Ισομερίωσης	

Υδρολυτική απαλογωνάσης	$\text{GSH} + \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{GSCH}_2\text{Cl} \rightleftharpoons \text{GSH} + \text{HCHO}$
Αντιδράσεις όπου η GSH οξειδώνεται	
Ρεδουκτάση δισουλφιδικού δεσμού	$2\text{GSH} + \text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH} \rightarrow 2 \text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH} + \text{GSSG}$
Υπεροξειδάσης	$2\text{GSH} + \text{C(CH}_3)_2\text{-O-OH} \rightarrow \text{C(CH}_3)_2\text{-OH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$
Θειοκυανικής ρεδουκτάσης	$2\text{GSH} + \text{CH}_3\text{-S-C}\equiv\text{N} \rightarrow \text{CH}_3\text{-SH} + \text{HCN} + \text{GSSG}$
Απογλουταθειονυλίωσης	$\text{GSH} + \text{Glu-S-G} \rightarrow \text{Glu-SH} + \text{GSSG}$
Διασκορβικής ρεδουκτάσης	$2\text{GSH} + \text{ascorbate} \rightarrow \text{ascorbate} + \text{GSSG}$
Αλκυλαρσενικής ρεδουκτάσης	$2\text{GSH} + \text{H}_3\text{C-As-O} \rightarrow \text{H}_3\text{C-As-OH} + \text{GSSG}$

1.7 Κατευθυνόμενη πρωτεϊνική εξέλιξη

Οι πρώτες προσεγγίσεις όσον αφορά στην εξέλιξη των πρωτεϊνών έχουν τεκμηριωθεί από τη δεκαετία του 1970 (Yang *et al.*, 2005). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εξέλιξη της πρωτεΐνης EbgA από την *Escherichia coli*, ένα ένζυμο που δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία δράση β-γαλακτοσιδάσης. Η εμφάνιση νέων λειτουργιών για το συγκεκριμένο ισοένζυμο δημιουργήθηκε έπειτα από μια σειρά μερικών μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα να αποκτήσει υδρολυτικές δράσεις ως προς μία ποικιλία σακχάρων (Hall *et al.*, 2003).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ενζυμική εξέλιξη έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο τεχνολογίας (Hollfelder, 2017; Tyzack *et al.*, 2017). Αυτή η τεχνολογία έχει προχωρήσει σημαντικά όσον αφορά στη διαθεσιμότητα των μοριακών βιολογικών εργαλείων, αλλά και στην υψηλή τεχνολογία όπου και χρησιμοποιείται. Αυτές οι νέες μεθοδολογίες έχουν απλοποιήσει τις πειραματικές διαδικασίες και διευκολύνουν την αναγνώριση μεταλλάξεων ακόμη και με μικρές βελτιώσεις στην επιθυμητή λειτουργία του ενζύμου (Babbitt *et al.*, 2014; Emond *et al.*, 2017). Επιπλέον, είναι δυνατόν να ελεγχθεί η ταχύτητα της μεταλλαξογένεσης σε ευρέως εφαρμοζόμενες μεθόδους, όπως η error-prone PCR. Επίσης, η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη της ποικιλομορφίας των αμινοξέων. Η ικανότητα

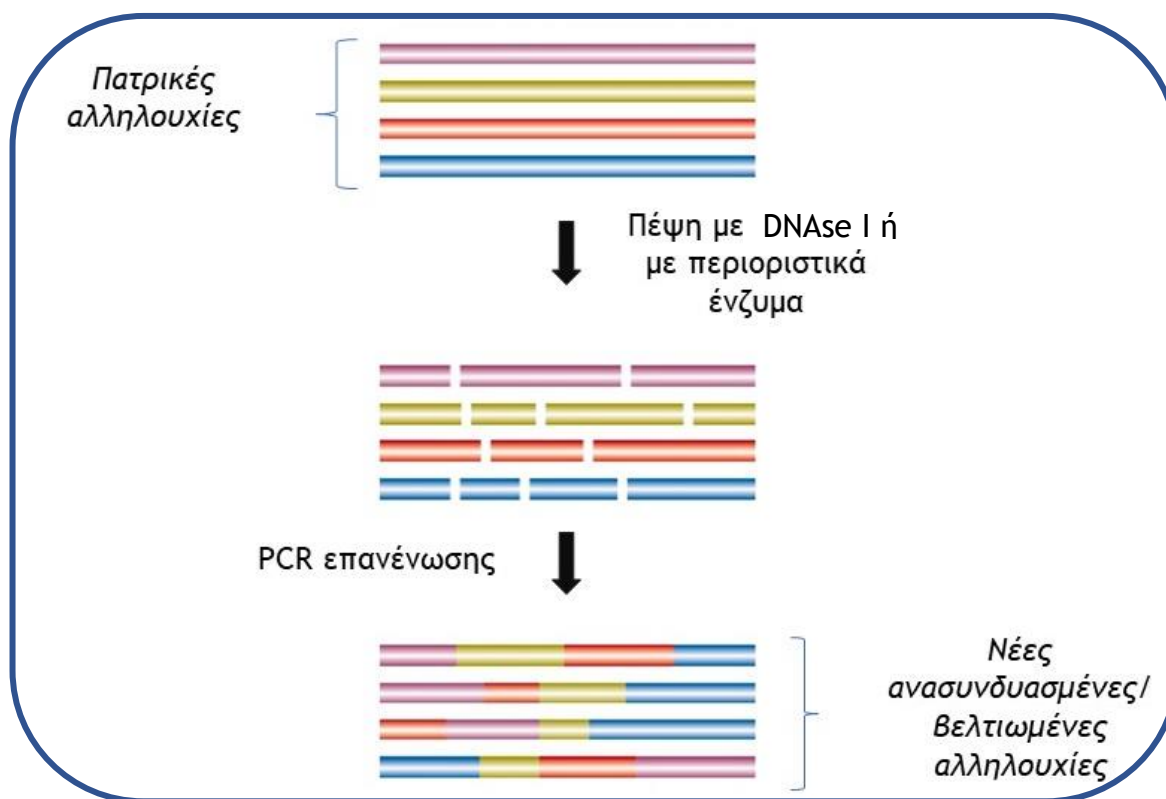
ταχείας απόκτησης πληροφοριών όσον αφορά στην αλληλουχία για τα γενετικά τροποποιημένα γονίδια δεν παρέχει απλώς τη γνώση σχετικά με τη σχέση αλληλουχίας-λειτουργίας πρωτεΐνης, αλλά επίσης ενισχύει την ικανότητά μας να επιλέξουμε τη στρατηγική που είναι η πλέον κατάλληλη για την εξέλιξη μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης (Yang *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2015; Alcalé, 2017).

Ένας από τους πρωταρχικούς στόχους του σχεδιασμού των πρωτεϊνών είναι η δημιουργία νέων ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες. Εκτός από την εμβάθυνση της κατανόησης των εξελικτικών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται στη φύση, η ικανότητα να προσφέρεται μια επιθυμητή δράση σε μια πρωτεΐνη ή ένα ένζυμο έχει ιδιαίτερα σημαντική πρακτική εφαρμογή (Lane and Seelig, 2014; Mate and Alcalé, 2015; Renata *et al.*, 2015; Alcalé, 2017). Δύο στρατηγικές χρησιμοποιούνται για την επίτευξη αυτού του στόχου. Η πρώτη είναι η *κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη*, στην οποία δημιουργούνται βιβλιοθήκες με κλώνους που διαθέτουν νέες επιθυμητές ιδιότητες (Griswold *et al.*, 2006; Platis and Labrou, 2008; Emond *et al.*, 2008; Rasila *et al.*, 2009; Dalby, 2011; Axarli *et al.*, 2016) και η δεύτερη είναι ο *ορθολογικός σχεδιασμός*, στον οποίο οι πρωτεΐνες τροποποιούνται με βάση την κατανόηση των δομικών και λειτουργικών συνεπειών μιας συγκεκριμένης αλλαγής ή σειράς αλλαγών (Kurtovic, 2008; Eriksen *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2014; Brown and Babbitt, 2014; Denard *et al.*, 2015; Pardo and Camarero, 2015). Ενώ η επιτυχία της κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι πλέον ευρέως εκτιμημένη, η σημερινή μας γνώση σχετικά με τις σχέσεις δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών είναι ακόμη σχετικά ανεπαρκής για να κάνει την ορθολογική σχεδίαση απόλυτα επιτυχημένη (Kikuchi *et al.*, 2000, 2002; Kawarasaki *et al.*, 2002; Chopra *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2015; Renata *et al.*, 2015).

Ο στόχος της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης είναι η μεγιστοποίηση της βελτίωσης των αλλαγών. Ο βαθμός επιτυχίας εξαρτάται από την ποικιλότητα που υπάρχει στη βιβλιοθήκη καθώς και από το μέγεθός της (Brusard *et al.*, 2011; Goldsmith *et al.*, 2012; Alcalé, 2017). Η κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη επιτρέπει τον άμεσο ανασυνδυασμό των ωφέλιμων μεταλλάξεων (Damborsky *et al.*, 2014; Stephens *et al.*, 2014). Σε αυτή τη μέθοδο ένας πληθυσμός από DNA αλληλουχίες κατακερματίζονται και επανενώνονται με τυχαίο τρόπο, δημιουργώντας νέες χιμαιρικές αλληλουχίες (Σχήμα 1.4). Υπάρχουν βέβαια και αλληλουχίες, στις οποίες οι μεταλλάξεις εισάγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επανασυναρμολόγησης (ποσοστό σφάλματος της

DNA πολυμεράσης) (Tao *et al.*, 2015; Alcalé, 2017). Μετά τη σάρωση της βιβλιοθήκης αναγνωρίζονται οι ακολουθίες που κωδικοποιούν τις επιθυμητές λειτουργίες. Η κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη μεταξύ γονιδίων της ίδιας οικογένειας επιτρέπει την ανταλλαγή αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομοιότητα πάνω από 60 % (Yang *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2015).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο Lars και η ομάδα του, οι οποίοι δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων ισοενζύμων που προέρχονται από κατακερματισμό και επανένωση των GSTM1-1 και GSTM2-2 με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Οι ειδικές δραστηριότητες των νέων ενζύμων διαφέρουν από τις πατρικές περισσότερο από 100-φορές (Lars *et al.*, 1999). Άλλο παράδειγμα αποτελεί ο Dixon και οι συνεργάτες του, που δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη 5.000 μεταλλαγμένων GST μορφών χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των ισοενζύμων *ZmGSTU1* και *ZmGSTU2*. Επτά από αυτά τα νέα ισοένζυμα εμφάνισαν 19-φορές υψηλότερη αποτοξινωτική δράση σε σχέση με τις πατρικές αλληλουχίες, με μόνο μία σημειακή μετάλλαξη (Dixon *et al.*, 2003). Ο Larsson και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη για να δημιουργήσουν μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων μορφών από δύο διαφορετικές GSTs της *theta* τάξης. Ένα χιμαιρικό ισοένζυμο εμφάνισε 5-πλάσια καταλυτική δραστηριότητα με το NPB σε σύγκριση με το φυσιολογικό ανθρώπινο GSTT1-1 (Larsson *et al.*, 2003).



Σχήμα 1.4: Διαδικασία ενζυμικής κατευθυνόμενης εξέλιξης (DNA shuffling).

Εκτός από την κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι όπου χρησιμοποιεί η πρωτεϊνική μηχανική για να τροποποιήσει μια πρωτεΐνη (Alcale, 2017). Η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση, όπου δημιουργούνται καθορισμένες μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή του γονιδίου μιας πρωτεΐνης, είναι μία από αυτές (Currin *et al.*, 2015; Sauer *et al.*, 2016). Μια άλλη μέθοδος, είναι η δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων με τη χρήση μονόκλωνων φορέων. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται σε τρία στάδια. Αρχικά, κλωνοποιείται το επιθυμητό γονίδιο σε πλασμιδιακό φορέα και μετατρέπεται σε μονόκλωνο DNA. Έπειτα, πραγματοποιείται υβριδισμός του μονόκλωνου DNA με κατάλληλο μεταλλαξογόνο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με τη μη-κωδική αλυσίδα και τέλος, γίνεται σύνθεση της κωδικής αλυσίδας με χρήση της DNA πολυμεράσης χρησιμοποιώντας σαν εκκινήτη μεταλλαξογόνο ολιγονουκλεοτίδιο (Joshi and Satyanarayana, 2015; Xy and Zhang, 2016; Cheng *et al.*, 2017; Firnberg and Ostermeier, 2017). Έτερη μέθοδος αποτελεί η κατευθυνόμενη τροποποίηση με PCR. Μέσω της PCR δημιουργούνται τόσο σημειακές μεταλλάξεις όσο και απομάκρυνση ή ένθεση μεγάλων δομικών περιοχών. Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι εξαιρετικά υψηλή (You and Zhang, 2012; Roberto *et al.*, 2017). Η τυχαία μεταλλαξογένεση με PCR αποτελεί και

αυτή μια μέθοδο που βασίζεται στην εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων είτε χημικά, με τη χρήση μεταλλαξογόνων χημικών ουσιών, είτε ενζυμικά με τη δράση της Taq πολυμεράσης (Parker and Liu, 2015; Porter *et al.*, 2016; Alcalé, 2017).

1.7.1 Πρωτεϊνική μηχανική και GSTs

1.7.1.1 Η διαμόρφωση των GSTs ιδανικό εργαλείο για το σχεδιασμό νέων λειτουργιών και ιδιοτήτων

Τα δομικά χαρακτηριστικά των GSTs, παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα για το σχεδιασμό τροποποιημένων ισοενζύμων με νέες καταλυτικές ιδιότητες (Axarli *et al.*, 2010, 2017; Zhao *et al.*, 2013; Labrou *et al.*, 2015; Skopelitou *et al.*, 2017, Axarli *et al.*, 2017). Μερικά από αυτά είναι τα εξής: (α) εμφάνιση εξαιρετικής ποικιλομορφίας όσον αφορά στις λειτουργίες, (β) διατήρηση της συμπαγούς αρχιτεκτονικής με συγκεκριμένα δομικά μοτίβα, καλά οργανωμένες περιοχές και διαφορετικές θέσεις σύνδεσης υποστρώματος και υδρόφοβης ένωσης (G-θέση, H-θέση και L-θέση), (γ) αποτελεσματική έκφραση σε υψηλές αποδόσεις μέσω των βακτηρίων *Escherichia coli* και καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας, και (δ) ύπαρξη των επιθυμητών δομών και των συμπλόκων τους μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X.

1.7.1.2 Δημιουργία ποικιλομορφίας

Μέθοδοι βασισμένες στη γενετική μηχανική

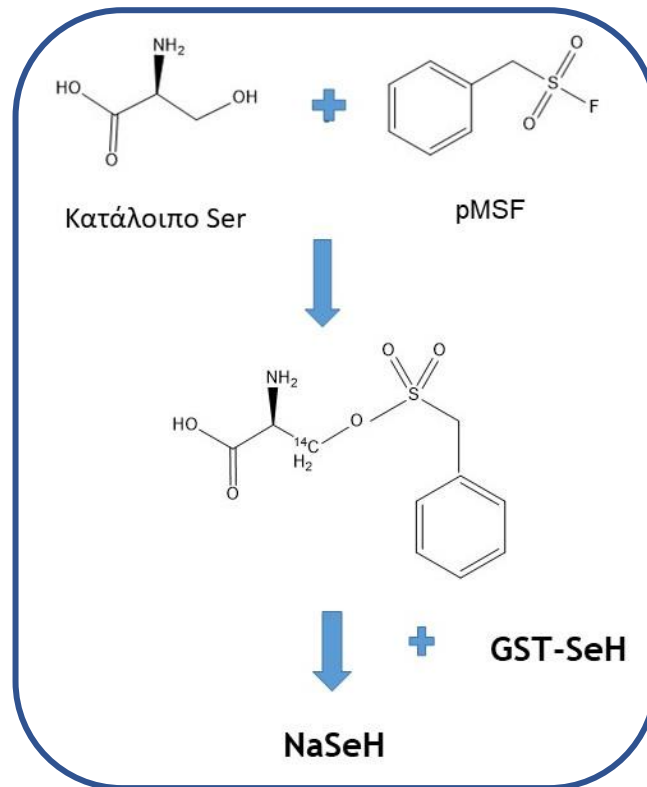
Οι βασικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν στο λογικό ανασχεδιασμό ή στην κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη (Kurtovic, 2008; Eriksen *et al.*, 2013). Στο λογικό ανασχεδιασμό, το προς μελέτη ισοένζυμο, με γνωστή τρισδιάστατη δομή, υποβάλλεται σε κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση ή μεταλλαξογένεση κορεσμού (Platis and Labrou, 2008; Li *et al.*, 2010; Siloto and Weselake, 2012; Tee and Wong, 2013). Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί δομικές πληροφορίες καθώς και υπολογιστικά προγράμματα για να προεπιλέξει τα κατάλληλα αμινοξέα για τη μεταλλαξογένεση (Verma *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2013). Η μέθοδος της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης αποτελείται από δύο στάδια. Το πρώτο αντιστοιχεί στη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης μεταλλάξεων και το δεύτερο στη σάρωση της βιβλιοθήκης με τις επιθυμητές ιδιότητες (Yuen and Liu, 2007; Cardone *et al.*, 2007; Kurtovic, 2008). Πολλές μέθοδοι, πλέον, είναι διαθέσιμες για τη δημιουργία της επιθυμητής γενετικής ποικιλομορφίας των GST. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι: η error-prone PCR

και το DNA shuffling (Platis and Labrou, 2008; Mannervik and Ayal, 2008; Rasila *et al.*, 2009; Axarli *et al.*, 2016).

Μέθοδοι βασισμένες στη χημική τροποποίηση και στην ενσωμάτωση μη φυσικών αμινοξέων

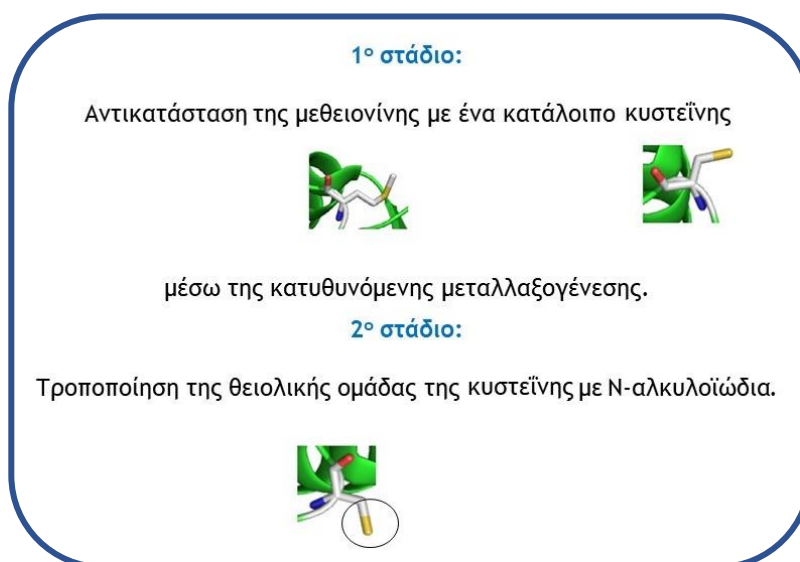
Το πεδίο της πρωτεϊνικής μηχανικής μπορεί να επεκταθεί ευρέως μέσω της ενσωμάτωσης μη φυσικών αμινοξέων, που φέρουν ποικίλες πλευρικές αλυσίδες, πέρα των είκοσι φυσικών αμινοξέων (Link *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014). Η προσέγγιση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με ειδικές *in vitro* αντιδράσεις χημικής τροποποίησης (Ravikummar *et al.*, 2015a,b) ή με ημισυνθετικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τον συνδυασμό μεταλλαξογένεσης και χημικής τροποποίησης.

Για παράδειγμα, χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία μια ειδική χημική μέθοδος *in vitro* τροποποίησης για τη δημιουργία μεταλλαγμένων GST με τροποποιημένες ιδιότητες οξειδοαναγωγής. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του καταλοίπου Ser με φθοριούχο φαινυλ-μεθυλ-σουλφονύλιο (pMSF) και στη συνέχεια αντίδραση με υδροσελίνιο για την εισαγωγή σεληνοκυστεΐνης στη δραστική θέση της Ser (Σχήμα 1.5). Η τροποποιημένη μορφή του ενζύμου παρουσίασε υψηλή δραστικότητα υπεροξειδάσης (Ren *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2008; Perperopoulou *et al.*, 2017).



Σχήμα 1.5: Δημιουργία τεχνητού σεληνοένζυμου μέσω χημικής τροποποίησης του δραστικού καταλοίπου της Ser. Το κατάλοιπο της Ser ενεργοποιείται από φθοριούχο φαινυλομεθυλοσουλφονύλιο (pMSF) και έπειτα το προϊόν αντιδρά με σουλφίδιο του υδρογόνου του νατρίου.

Μια άλλη ημισυνθετική προσέγγιση αναπτύχθηκε από το Norrgård και τους συνεργάτες του και βασίστηκε σε πρωτόκολλο δύο σταδίων. Αρχικά, περιελάμβανε την αντικατάσταση των επιλεγμένων καταλοίπων με Cys, μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης και έπειτα την τροποποίηση της θειόλης της Cys, για τη δημιουργία υποκατεστημένων Cys-X. Το ημισυνθετικό ένζυμο hGSTM2-2 παρουσίασε διαφορετική εκλεκτικότητα σε σχέση με το μη-τροποποιημένο (Norrgård *et al.*, 2011) (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Παρουσίαση της ημισυνθετικής προσέγγισης που αναπτύχθηκε από τους Norrgård *et al.*, 2011.

Μέθοδοι ανίχνευσης και επιλογής των GSTs

Η επιτυχής εφαρμογή της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης απαιτεί την ανάπτυξη μεθόδων υψηλής απόδοσης για τον έλεγχο και επιλογή μεταλλαγμένων μορφών. Αυτές οι μέθοδοι περιορίζουν την προσπάθεια και το κόστος αυξάνοντας την πιθανότητα απόκτησης GSTs με την επιθυμητή ιδιότητα. Μέθοδοι κατάλληλες για την επιλογή των GSTs έχουν ήδη αναπτυχθεί και κάποιες από αυτές προκαλούν το σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων, από τις αντιδράσεις που καταλύουν, ενώ άλλες χρησιμοποιούν πολύ ευαίσθητα υποστρώματα που φθορίζουν (Kurtovic *et al.*, 2007; Morou *et al.*, 2010; Yasgar *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Fujikawa *et al.*, 2008, 2015; Perperoulou *et al.*, 2017).

Μια ευρέως εφαρμόσιμη μέθοδος αναδείχθηκε από τους Scopelίτου και Labrou (Scopelίτου *et al.*, 2010). Οι συγγραφείς έχουν αναπτύξει μια χρωματομετρική μέθοδο απελευθέρωσης ιόντων αλογόνου που καταλύεται με GST. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων, ανεξάρτητα από τη φύση του αλογόνου που απελευθερώνεται. Η δοκιμασία βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος με την αντίδραση του $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ με τα ιόντα αλογόνου που ελευθερώνονται παρουσία Fe^{3+} .

Επανασχεδιασμός της Η-θέσης μέσω της πρωτεϊνικής μηχανικής

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η Η-θέση είναι αυτή που καθορίζει την εκλεκτικότητα ενός ισοενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Αυτό συμβαίνει επειδή μικρές αλλαγές στην

περιοχή παρέχουν σημαντικές διαφορές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φυτικές GSTs της *tau* και *phi* τάξης. Η ικανότητα αποτοξίνωσης αγροχημικών και των περιβαλλοντικών ρύπων από τις GSTs παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Labade *et al.*, 2018; Craft *et al.*, 2018). Οι GSTs αυτών των τάξεων είναι υπεύθυνες για την καταλυτική δράση των εξαρτώμενων από την GSH αντιδράσεων με τα φυτοφάρμακα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας των ζιζανιοκτόνων στις καλλιέργειες και τα ζιζάνια (Xu *et al.*, 2016 Prasad and Roy, 2017). Επομένως, αποτελούν στόχους για την ανάπτυξη νέων λειτουργιών αποτοξίνωσης για τα φυτοφάρμακα (Xu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη της Axarli και των συνεργατών της, κατά την οποία δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη τριών τάξεων GSTs από την *Glycine max* (*GmGSTU2-2*, *GmGSTU4-4* και *GmGSTU10-10*) (Axarli *et al.*, 2016). Οι συγγραφείς ταυτοποίησαν μια μετάλλαξη που παρουσίαζε περίπου 10-φορές υψηλότερη δράση αποτοξικοποίησης έναντι του CDNB και του fluorodifen και μια ασυνήθιστη συνεργιστική κινητική ως προς CDNB και fluorodifen. Ανάλυση του ισοενζύμου με κρυσταλλογραφία περίθλασης ακτίνων X αποκάλυψε ότι η σημειακή μετάλλαξη Trp114Cys ήταν υπεύθυνη για τις ιδιότητες αυτές.

Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο Labrou και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση τροποποίησαν τρία κατάλοιπα της Η-θέσης (Trp12, Phe35 και Ile118) του ισοενζύμου GST I της *phi* τάξης από *Zea mays* προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβολή τους στη δέσμευση του υποστρώματος και στην κατάλυση (Labrou *et al.*, 2004). Οι συγγραφείς έδειξαν ότι τα τρία κατάλοιπα επηρεάζουν την εξειδίκευση του ενζύμου έναντι διαφορετικών ξενοβιοτικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων. Σε μια άλλη μελέτη, η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε το ρόλο του καταλοίπου Arg111 στο ισοένζυμο *GmGSTU4-4* χρησιμοποιώντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση. Διαπίστωσαν ότι το ισοένζυμο που έφερε τη μετάλλαξη Arg111Ala δεν παρουσίασε καμία μεταβολή όσο αφορά την τιμή της K_m για την GSH, αλλά έδειξε μειωμένη συγγένεια για τα ξενοβιοτικά υποστρώματα. Επίσης, έδειξε υψηλότερη k_{cat} και ειδική δραστηριότητα έναντι των αρωματικών υποστρωμάτων και χαμηλότερη ειδική δραστηριότητα έναντι αλειφατικών υποστρωμάτων. Ο πολυλειτουργικός ρόλος του καταλοίπου Arg111, υποδηλώνει ότι αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό στόχο για την εξειδίκευση της Η-θέσης.

Επανασχεδιασμός των συντηρημένων καταλοίπων της G-θέσης

Τα συντηρημένα κατάλοιπα της G-θέσης αποτελούν ενδιαφέροντες στόχους πρωτεϊνικής μηχανικής με στόχο τη βελτιστοποίηση μιας ποικιλίας διαφορετικών κινητικών ιδιοτήτων. Εκτεταμένη έρευνα για το ρόλο των καταλοίπων αυτών έχει επιτευχθεί στη *phi* τάξη, GSTF1-1 από *Zea mays* (Labrou *et al.*, 2001a, b), στην *tau* τάξη, GST4-4 από *Glycine max* (Axarli *et al.*, 2010), στο ισοένζυμο GSTU1-1 από *Pinus tabulae formis* (Zeng and Wang, 2005), κ.ά. Τα αποτελέσματα από αυτές τις έρευνες έδειξαν ότι τα κατάλοιπα της συγκεκριμένης δομικής περιοχής διαμορφώνουν όχι μόνο τη σύνδεση της GSH αλλά και άλλες μη αναμενόμενες καταλυτικές και δομικές ιδιότητες. Μερικές από αυτές είναι ότι:

1. Επηρεάζουν τη συγγένεια (K_m) της G-θέσης με τη GSH και συμβάλλουν στη συγγένεια της H-θέσης με το ξενοβιοτικό υπόστρωμα, υποδηλώνοντας μια επικοινωνία μεταξύ των δύο θέσεων.
2. Επηρεάζουν τον ιονισμό της θειόλης της GSH, και έτσι καθορίζουν τη δραστηρότητά της έναντι αντιδράσεων πυρηνόφιλης υποκατάστασης.
3. Συμμετέχουν έμμεσα στη ρύθμιση της σταθεράς κατάλυσης (k_{cat}).
4. Επηρεάζουν τη δομική σταθερότητα και αναδίπλωση του ενζύμου καθώς και την ευκαμψία της α_2 έλικας.
5. Συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων που επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων υπομονάδων και συνεπώς ελέγχουν τις αλλοστερικές ιδιότητες του ισοενζύμου.
6. Επηρεάζουν το ηλεκτροστατικό δυναμικό του ενεργού κέντρου.
7. Μερικά από τα κατάλοιπα της G-θέσης (Arg14, Lys45, Gln52, Gln65 και Asp99) συμμετέχουν στο σχηματισμό του δικτύου κατανομής ηλεκτρονίων που βοηθά το γλουταμυλο α -καρβοξυλικό άκρο της GSH να λειτουργεί ως βάση που δέχεται το πρωτόνιο από την -SH ομάδα (Labrou *et al.*, 2001a,b; Winayanuwattikun and Ketterman, 2004, 2005; Axarli *et al.*, 2010, 2016; Perperopoulou *et al.*, 2017).

1.8 Παράγοντες που καθορίζουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών έναντι θερμοκρασίας

Πολλή προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στη βελτίωση της σταθερότητας και δραστηρότητας των ενζύμων για την επέκταση των εφαρμογών τους (Foreman *et al.*, 2001). Ο όρος σταθερότητα αναφέρεται στην αντίσταση των πρωτεϊνών σε διάφορες

επιδράσεις θέρμανσης ή άλλων αποσταθεροποιητικών παραγόντων με διατήρηση της πρωτεϊνικής δομής τους ή τη βιολογική λειτουργία τους (Fagain, 1995). Αναλυτικότερα, ο όρος θερμοσταθερότητα αναφέρεται στην αντίσταση ή στη μη-αναστρεψιμότητα των χημικών και φυσικών αλλαγών μιας ουσίας που μπορεί να επιφέρει η αυξημένη θερμοκρασία. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών αναφέρεται σε αλλαγές που μπορούν να επηρεάσουν την μοναδική τρισδιάστατη δομή τους και τις χημικές ιδιότητες των πολυπεπτιδικών αλυσίδων τους (Zhou *et al.*, 2008; Kumwenda *et al.*, 2013).

Η σταθερότητα των πρωτεϊνών αναφέρεται στην ικανότητα αυτών να διατηρούν τη φυσιολογική τρισδιάστατη δομή τους κάτω από θερμικές διακυμάνσεις ή χημικούς αποδιατακτικούς παράγοντες (Wintrobe and Arnold, 2000). Ο όρος «φυσιολογική» κατάσταση δεν αναφέρεται σε μια μοναδική διαμόρφωση. Από την άλλη πλευρά, η αποδιαταγμένη κατάσταση αποτελείται επίσης από πολλές διαμορφώσεις που όμως δεν μπορούν να αντιπροσωπευτούν από μια μέση διαμόρφωση (Wintrobe and Arnold, 2000). Τόσο η φυσιολογική, όσο και η αποδιαταγμένη κατάσταση είναι θερμοδυναμικά καλά ορισμένες και η πρωτεϊνική σταθερότητα μπορεί να εκφραστεί ως η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας Gibbs των δύο αυτών καταστάσεων. Η ισορροπία μεταξύ της φυσιολογικής και της αποδιαταγμένης κατάστασης εξαρτάται από την θερμοκρασία (Wintrobe and Arnold, 2000).

Η ελεύθερη ενέργεια σταθεροποίησης μιας σφαιρικής πρωτεΐνης, είτε είναι θερμοφιλή είτε μεσόφιλη, είναι αρκετά χαμηλή. Δεν είναι μεγαλύτερη από 7-15 kcal/mol, η οποία είναι ισοδύναμη με την ενέργεια που παράγεται ως αποτέλεσμα του σχηματισμού μερικών δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής σημαντικά στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι υπάρχει κάποια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση (π.χ υδρογονικοί δεσμοί, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις) που να παίζει σημαντικό ρόλο στις πρωτεΐνες που είναι σταθερές σε θερμοκρασία άνω των 100 °C έναντι αυτών που είναι σταθερές σε θερμοκρασία 50 °C, ή ότι οι δομές πολύ σταθερών πρωτεϊνών είναι σημαντικά διαφορετικές σε σύγκριση με δομές λιγότερο σταθερών πρωτεϊνών (Daniel *et al.*, 1996; Tattersall *et al.*, 2012). Οι υπερθερμοφιλεις πρωτεΐνες δε διαφοροποιούνται σημαντικά από τις μεσόφιλες, δηλαδή δεν παρουσιάζουν πολύ διαφοροποιημένες ιδιότητες (Daniel *et al.*, 1996; Wintrobe and Arnold, 2000).

Η ενεργειακή σταθεροποίηση μιας πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα της προσθετικής δράσης ενός μεγάλου αριθμού αλληλεπιδράσεων σε διαφορετικές περιοχές στο εσωτερικό του μορίου (Daniel *et al.*, 1996). Εκτός από τους ομοιοπολικούς δεσμούς, η φυσιολογική δομή μιας πρωτεΐνης συγκρατείται και από ένα μεγάλο αριθμό ασθενών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμούς υδρογόνου μεταξύ προστατευμένων ομάδων και γέφυρων άλατος, καθώς επίσης και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και διαλύτη που προέρχονται από την προστασία ή την έκθεση πολικών και μη πολικών ομάδων (Wintrode and Arnold, 2000; Kumwenda *et al.*, 2013). Η συνεισφορά των παραπάνω δυνάμεων στην πρωτεϊνική σταθερότητα δεν μπορεί ακόμη να κατανοηθεί πλήρως επειδή η εξάρτησή τους από την θερμοκρασία είναι αρκετά περίπλοκη. Η απομάκρυνση των μη-πολικών ομάδων από τον υδατικό παράγοντα και η στροφή τους προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης είναι σίγουρα ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες σταθεροποίησης των φυσιολογικών πρωτεϊνών (Daniel *et al.*, 1996; Wintrode and Arnold, 2000). Οι γέφυρες άλατος που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου θεωρούνται ότι συνεισφέρουν λιγότερο στη σταθερότητα, εντούτοις μπορεί να είναι σταθεροποιητικές σε υψηλότερες θερμοκρασίες καθώς αλλάζουν τις ελεύθερες ενέργειες διαλυτότητας των φορτισμένων ομάδων (Wintrode and Arnold, 2000).

Οι περισσότεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς ενδογενούς σταθεροποίησης των πρωτεϊνών τους. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να συνοψιστούν ως εξής (Dams *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003; Leone *et al.*, 2004; Pechkova *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Wintrode and Arnold, 2000; Taylor and Vaisman, 2010; Coleman and Sharp, 2010; Dams and Fu, 2010; Guo *et al.*, 2013; Kumwenda *et al.*, 2013):

1. Μεγαλύτερο πακετάρισμα με αποτέλεσμα υψηλότερη πυκνότητα του υδρόφοβου πυρήνα, υψηλότερη υδροφοβικότητα, μείωση του όγκου ή του αριθμού των κοιλοτήτων
2. Πρόσθετες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που είναι αποτέλεσμα περισσότερων ή πιο ισχυρών γέφυρων άλατος ή δικτύων γέφυρων άλατος
3. Βελτιωμένους δεσμούς υδρογόνου ή βελτιωμένα δίκτυα δεσμών υδρογόνου (καλύτερη σταθεροποίηση α-ελίκων και δευτεροταγών στοιχείων δομής)
4. Περισσότερες δισουλφιδικές γέφυρες

5. Μείωση των διαμορφωτικών αλλαγών (π.χ. σταθεροποίηση των βρόγχων μέσω αυξημένων καταλοίπων προλίνης) και επέκταση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής (αυξημένος σχηματισμός α-ελίκων και β-ελασμάτων)
6. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χημικές τροποποιήσεις
7. Διαφορετικές αναλογίες εκτεθειμένων /κρυμμένων καταλοίπων, υδρόφοβων/πολικών περιοχών
8. Μείωση αριθμού ή μήκους των βρόγχων (ειδικά των επιφανειακών)
9. Βελτίωση των αλληλουχιών των β-ελασμάτων
10. Λιγότερα θερμοευαίσθητα κατάλοιπα
11. Υψηλότερο ισοηλεκτρικό σημείο
12. Αντικατάσταση μεγάλων αμινοξικών καταλοίπων με μικρότερα και τοποθέτηση υδρόφοβων καταλοίπων σε θέσεις μερικώς εκτεθειμένες στην επιφάνεια.

1.9 Βιοαισθητήρες

1.9.1 Εισαγωγή

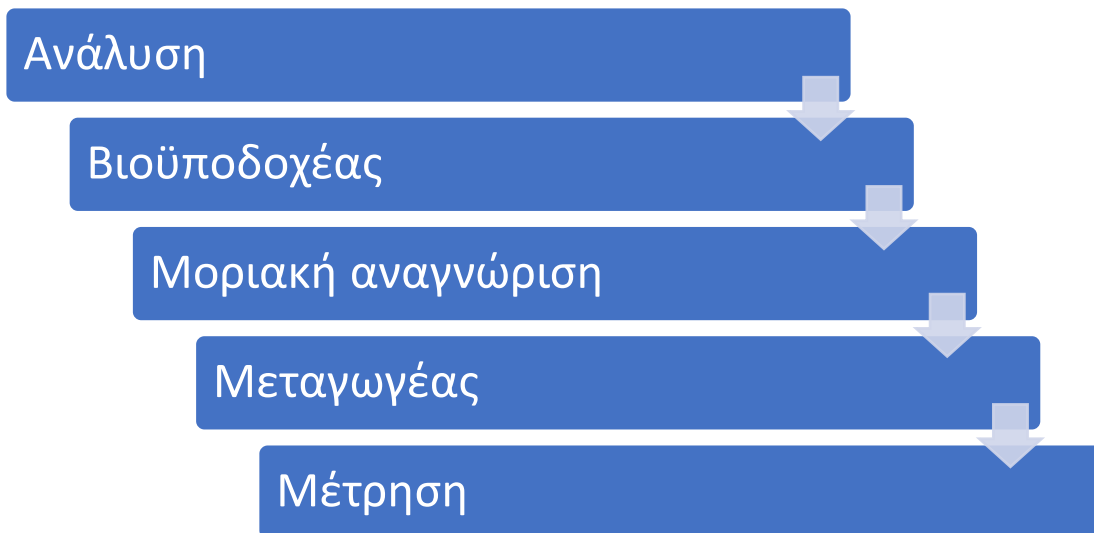
Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων έχουν καταστεί ιδιαίτερες σημαντικές τα τελευταία χρόνια λόγω της αλόγιστης χρήσης τους στη γεωργία. Λειτουργούν ως χημικοί παράγοντες για την πρόληψη του πολλαπλασιασμού των επιβλαβών παρασίτων (ζιζάνια, έντομα, μούχλα ή μύκητες) αλλά παράλληλα παρεμβαίνουν και στις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες άλλων οργανισμών (Singh, 2011; Amaral, 2014). Τα φυτοφάρμακα είναι απαραίτητα για τη σύγχρονη γεωργία και χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε αγροτικά πεδία για τον έλεγχο της επίθεσης εντόμων, μυκήτων και τρωκτικών στις καλλιέργειες, για τη μείωση της ανάπτυξης ζιζανίων, για την αύξηση της γεωργικής παραγωγικότητας, αυξάνοντας έτσι τις αποδόσεις των καλλιεργειών και μειώνοντας τις απώλειες μετά τη συγκομιδή (Hua *et al.*, 2009; Odukkathi and Vasudevan, 2013; Meng *et al.*, 2013).

Μεγάλη ποσότητα φυτοφαρμάκων φθάνει στο έδαφος, στον αέρα, στο νερό, στα τρόφιμα και σε άλλα συστήματα μέσω της διάχυσης. Αυτό μπορεί να προκαλέσει διάφορα προβλήματα αν εισέλθει στην τροφική αλυσίδα. Μερικά από αυτά τα φυτοφάρμακα είναι πολύ τοξικά, μεταλλαξογόνα, καρκινογόνα και ογκογόνα. Τα κυριότερα και τα πλέον επικίνδυνα φυτοφάρμακα είναι τα νευροτοξικά διότι αναστέλλουν αναστρέψιμα το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, ένα βασικό ένζυμο για

τη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος στον άνθρωπο και στα έντομα (Sassolas *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Marraza, 2014). Τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων αποτελούν σημαντικό παράγοντα ανησυχίας, λόγω της βιοσυσσωρευτικής δράσης τους, της υψηλής τοξικότητας και της μακροπρόθεσμης βλάβης που επιφέρουν τόσο στο περιβάλλον όσο και στη ζωή, παρόλο που η συγκέντρωσή τους είναι πολύ χαμηλή.

Η ανάλυση των φυτοφαρμάκων διεξάγεται συνήθως με τη χρήση συμβατικών τεχνικών όπως η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και άλλες φασματοσκοπικές μέθοδοι (Jaffrezic-Renault, 2001; Verma and Bhardwaj, 2015). Αυτές οι τεχνικές απαιτούν υψηλής τεχνολογίας οργανολογία με υψηλό κόστος (Velasco-Garcia *et al.*, 2003; Iang *et al.*, 2008). Η τεχνολογία του βιοαισθητήρα επιλύει αυτά τα προβλήματα χρησιμοποιώντας ένα στοιχείο βιολογικής ανίχνευσης (βιοϋποδοχέα) συνδεδεμένο με έναν μετατροπέα για τη μετατροπή μιας παρατηρούμενης απόκρισης σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Το μέγεθος του σήματος είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της υπό εξέταση χημικής ουσίας στην οποία δεσμεύεται το στοιχείο βιολογικής ανίχνευσης του βιοαισθητήρα. Οι βιοαισθητήρες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία περιλαμβάνουν απλότητα, υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία, γρήγορη απόκριση, χαμηλό κόστος, φορητότητα, σχετικά μικρό μέγεθος, φιλική προς το χρήστη λειτουργία και συνεχή αναλυτική λειτουργία (Verma and Bhardwaj, 2015).

Οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται με βάση τον τύπο των στοιχείων βιο-αναγνώρισης (π.χ. ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊνικό οξύ, ολόκληρο κύτταρο κλπ.) και έπειτα με τη μέθοδο μετάδοσης του σήματος (οπτική, ηλεκτροχημική, κ.ά.) (Σχήμα 1.7). Ο βιοαισθητήρας, ως μια εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές ανάλυσης, έχει βρει εφαρμογή κυρίως στην υγειονομική περίθαλψη, τις περιβαλλοντικές εφαρμογές, τη βιομηχανία τροφίμων και τις γεωργικές πρακτικές (Mehrotra, 2016; Bahadir and Sezginturk, 2015). Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων είναι μια αναπτυσσόμενη ερευνητικά περιοχή, ανταποκρινόμενη στη ζήτηση για ταχείες, απλές, επιλεκτικές και χαμηλού κόστους αναλύσεις φυτοφαρμάκων, οργανοφωσφορικά, οργανοχλωρίδια, καρβαμικά και όχι μόνο (Verma and Dhillon, 2003; Verma and Bhardwaj, 2015).



Σχήμα 1.7: Βασική αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα.

1.9.2 Τεχνολογία του βιοαισθητήρα

Η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα απαιτεί την ακινητοποίηση του (βιο)υποδοχέα και τη διεπαφή του με τον μετατροπέα. Η ακινητοποίηση εξασφαλίζει τόσο τη σταθεροποίησή του όσο και την ευαισθησία (Sara *et al.*, 2005). Οι μέθοδοι ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται γενικά είναι: η φυσική προσρόφηση σε ένα στερεό επίπεδο, η διασύνδεση μεταξύ των μορίων, η ομοιοπολική σύνδεση με μια επιφάνεια και η παγίδευση μέσα σε ένα σύστημα μεμβράνης ή ένα πολυμερές.

Πρόοδος στον τομέα των βιοαισθητήρων επικεντρώνεται κυρίως με την αναβάθμιση των βιολογικών συστατικών που χρησιμοποιούνται και με την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας (τεχνολογίες μικροσυστημάτων). Όσον αφορά στους (βιο)υποδοχείς του βιοαισθητήρα, τα ένζυμα είναι μία από τις καταλληλότερες επιλογές για την κατασκευή βιοαισθητήρων φυτοφαρμάκων, επειδή διαθέτουν υψηλή χημική εξειδίκευση (Scheller *et al.*, 2001; Verma and Bhardwaj, 2015).

1.9.3 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ένζυμα

Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες, για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων, κατασκευάζονται με βάση δύο αρχές. Η πρώτη στηρίζεται στις μετρήσεις της αναστολής των ενζύμων (έμμεση προσέγγιση) και η δεύτερη βασίζεται στην άμεση μέτρηση των ενώσεων που εμπλέκονται στην ενζυμική αντίδραση. Τα τελευταία χρόνια, οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες που βασίζονται στην αναστολή του ενζύμου, δηλαδή στην ποσοτικοποίηση του αναστολέα με μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας τόσο

απουσία όσο και παρουσία του αναστολέα, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον (Justino *et al.*, 2015; Amine *et al.*, 2016).

Στους βιοαισθητήρες με βάση τα ένζυμα, το βιολογικό στοιχείο είναι το ένζυμο το οποίο συνδέεται με έναν μετατροπέα. Τα ένζυμα αντιδρούν επιλεκτικά με την αναλυόμενη ουσία και παράγουν ένα σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης του στόχου (Guilbault *et al.*, 2004; Lucarelli *et al.*, 2008; Teles and Fonseca, 2008). Αυτό το σήμα μπορεί να προκύψει από μεταβολή της συγκέντρωσης πρωτονίων, απελευθέρωση ή πρόσληψη αερίων, εκπομπή φωτός, απορρόφηση ή ανάκλαση, εκπομπή θερμότητας κ.ο.κ., που προκαλείται από την αντίδραση που καταλύει το ένζυμο. Ο μετατροπέας μετατρέπει αυτό το σήμα σε μετρήσιμη απόκριση, όπως ρεύμα, δυναμικό, αλλαγή θερμοκρασίας ή απορρόφηση φωτός μέσω ηλεκτροχημικών, θερμικών ή οπτικών μέσων. Αυτό το σήμα μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω, να υποβληθεί σε επεξεργασία ή να αποθηκευτεί για μεταγενέστερη ανάλυση (Cooper and Singleton, 2007; Luong *et al.*, 2008; Korotkaya, 2014). Η ενσωμάτωση προηγμένων υλικών (νανοϋλικά) προάγει την ευαισθησία, τη σταθερότητα και το όριο ανίχνευσης των βιοαισθητήρων που βασίζονται στα ένζυμα.

Ο πρώτος ενζυμικός βιοαισθητήρας περιεγράφηκε από τους Clark και Lyons το 1962 (Clark and Lyons, 1962), οι οποίοι ακινητοποίησαν την οξειδάση της γλυκόζης (GOD) στην επιφάνεια ενός αμπερομετρικού ηλεκτροδίου μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί άμεσα η συγκέντρωση γλυκόζης σε ένα δείγμα. Έκτοτε, έχουν αναπτυχθεί πολλοί βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό της γλυκόζης (D'Orazio, 2003; Wang, 2001, 2008; Wilson and Gifford, 2005; Andreescu and Marty, 2006). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα ενζυμικού βιοαισθητήρα είναι η ανίχνευση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα. Ο πρώτος βιοαισθητήρας γι' αυτό το σκοπό δημιουργήθηκε από τον Trettnak και τους συνεργάτες του (Trettnak *et al.* 1993). Πρόσφατα, ο Arya και η ομάδα του δημιούργησαν έναν βιοαισθητήρα, για τον ίδιο σκοπό, χρησιμοποιώντας την οξειδάση της χοληστερόλης από *Sterptomyces hygrosopicus* (Arya *et al.*, 2008). Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος του αίματος αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέτρηση γιατί είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης πρόγνωσης της επιβίωσης του ασθενούς. Για το λόγο αυτό ο Mo και ο Smart ανέπτυξαν έναν ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα ανίχνευσης των επιπέδων του γαλακτικού οξέος

στο αίμα. Έτσι, μετρώντας την οξειδάση της γαλακτόζης παρέχεται ταχεία ανταπόκριση στις αλλαγές των επιπέδων στον ασθενή (Mo and Smart, 2004).

Όσο αναφορά στον περιβαλλοντικό τομέα, οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση και ανάλυση της τοξικότητας του υδροφόρου ορίζοντα καθώς και για περιβαλλοντική παρακολούθηση άλλων τοξικών παραγόντων (Rogers, 2006). Αρκετά ένζυμα όπως η χολινεστεράση (AChE, BChE) και η ουρεάση έχουν χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Πολλοί βιοαισθητήρες με βάση την αναστολή της χολινεστεράσης, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων (Gogol *et al.*, 2000, Andreescu *et al.*, 2001, 2003, Choi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Jeanty *et al.*, 2002; Turdean *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003; Danet *et al.*, 2003; Brasil de Oliveira *et al.*, 2004; Crew *et al.*, 2004; Pavlov *et al.*, 2005) όσο και για την ανίχνευση καρβαμιδικών παρασιτοκτόνων (Lee *et al.*, 2001, Kok and Hasirci, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

Παρά τη μεγάλη έρευνα που γίνεται για τους βιοαισθητήρες που εφαρμόζονται στην ανάλυση τροφίμων, υπάρχουν ελάχιστοι οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Τα μειονεκτήματα που πρέπει να ξεπεραστούν είναι αρκετά, όπως η περιορισμένη διάρκεια ζωής των βιολογικών συστατικών και η μαζική παραγωγή τους. Ο πρώτος βιοαισθητήρας που δημοσιεύθηκε ήταν για τον προσδιορισμό της φρουκτόζης. Δημιουργήθηκε ακινητοποιώντας την αφυδρογονάση της φρουκτόζης (FDH) πάνω σε μια λεπτή, μη αγωγή μεμβράνη (Mello and Kubota, 2002). Ένας άλλος διαθέσιμος αμπερομετρικός βιοαισθητήρας δημιουργήθηκε για τη μέτρηση της αιθανόλης μέσω της αντίστοιχης οξειδάσης της. Η μέτρηση της αιθανόλης βασίζεται στο σήμα που παράγεται από το H₂O₂, το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης (Boujtita *et al.*, 2000).

1.9.4 Νανοτεχνολογία και βιοαισθητήρες (νανοβιοαισθητήρες)

Η πολλά υποσχόμενη σχέση μεταξύ των νανοτεχνολογιών και της τεχνολογίας των αισθητήρων έχει τεθεί σε ισχύ τα τελευταία χρόνια. Τα νανοϋλικά παρουσιάζουν τεράστιες δυνατότητες για την περαιτέρω ανάπτυξη της τεχνολογίας των βιοαισθητήρων. Η ακινητοποίηση των νανοϋλικών στο τμήμα ανίχνευσης του βιοαισθητήρα αυξάνει την ευαισθησία ανίχνευσης των αναλυόμενων ουσιών. Λόγω των ανεξέλεγκτων φυσικών, χημικών, μαγνητικών και οπτικών ιδιοτήτων τους,

διάφορες κατηγορίες νανοϋλικών, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού (Pan *et al.*, 2007) και οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) (Cui, 2007) έχουν εφαρμοστεί σε βιοαισθητήρες καθώς ενισχύουν την ευαισθησία και την εξειδίκευσή τους. Τα νανοϋλικά βελτιώνουν τις συνολικές επιδόσεις της λειτουργίας των βιοαισθητήρων (Kerman *et al.*, 2008).

Τα νανοσωματίδια χρυσού παρέχουν ένα συμβατό μικροπεριβάλλον για το βιοαισθητήρα μέσω του οποίου αυξάνεται η ποσότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ευαισθησίας και τη συνολική εμφάνιση του βιοαισθητήρα (Liang *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008). Έχουν αναπτυχθεί οπτικοί βιοαισθητήρες βασιζόμενοι σε νανοσωματίδια χρυσού για την άμεση ανίχνευση χημικών οργανοφωσφορικών παραγόντων και παρασιτοκτόνων (Simonian *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2008).

Οι νανοβιοαισθητήρες έχουν κατασκευαστεί για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του GST ενζύμου μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασής του με την ανηγμένη μορφή της GSH (Vello *et al.*, 2017). Ο Saatci και οι συνάδελφοί του κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα που βασίζεται σε δύο διαφορετικούς τύπους GSTs, προκειμένου να ανιχνεύσει βαρέα μέταλλα, όπως ο Zn^{2+} και ο Cd^{2+} . Πιο συγκεκριμένα, ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε ακινητοποιώντας την πρωτεΐνη στην επιφάνεια χρυσού (Saatci *et al.*, 2007).

1.10 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs

Οι GSTs παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αρκετούς κλάδους των θετικών επιστημών. Ορισμένοι από αυτούς είναι η βιολογία, η βιοτεχνολογία, η γεωπονία, η ιατρική, η νανοτεχνολογία καθώς και η χημεία. Στη γεωπονία, οι πιο σημαντικές λειτουργίες των GSTs σχετίζονται με τη συμμετοχή τους σε μηχανισμούς που ενισχύουν την ανθεκτικότητα των φυτών, έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, αλλά και σε μηχανισμούς αδρανοποίησης ζιζανιοκτόνων (Σχήμα 1.8).

1.10.1 Γεωργική βιοτεχνολογία

Η γεωργική βιοτεχνολογία έχει ήδη ξεκινήσει να αλλάζει τα δεδομένα στο γεωργικό πεδίο και χωρίζεται σε τρεις βασικούς τομείς: στον έλεγχο της ανάπτυξης των φυτών, στην προστασία των φυτών από το βιοτικό/αβιοτικό στρες και στην παραγωγή ειδικών τροφίμων/φυτών, βιοχημικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Kissoudis *et al.*, 2015a,

b; Saha *et al.*, 2016). Αντιμετωπίζει μερικές μεγάλες προκλήσεις όπως ανακούφιση από τους κινδύνους αβιοτικού στρες (αλατότητα, ξηρασία και ακραίες θερμοκρασίες), βελτίωση του ελέγχου των επιβλαβών οργανισμών, διατήρηση και βελτίωση του περιβάλλοντος καθώς και βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων (Altman, 2002; Labrou *et al.* 2015; Kissoudis *et al.*, 2016; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Υπάρχουν ταυτόχρονα δύο παράλληλες ερευνητικές προσεγγίσεις. Η πρώτη αφορά τη διαγονιδιακή προσέγγιση (έκφραση γονιδίων, ειδικών προαγωγέων και παραγόντων μεταγραφής) και η δεύτερη τη μη-διαγονιδιακή προσέγγιση (υποβοηθούμενη γονιδιωματική ανακάλυψη γονιδίων, επιλογή με δείκτη, αποτελεσματικές μεταλλάξεις) (Barrows *et al.*, 2014; Moshelion and Altman, 2015; Saha *et al.*, 2016). Ο συνδυασμός καινοτόμων μοριακών εργαλείων, τεχνολογιών προσυμπτωματικού ελέγχου και οικονομικής αξιολόγησης θα πρέπει να γίνει ο κύριος στόχος της βιοτεχνολογικής επανάστασης στη γεωργία.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαγονιδιακής τροποποίησης αποτελεί η μελέτη του Roxas και των συνεργατών του καθώς πέτυχαν αυξημένη βλάστηση και βελτιωμένη ανάπτυξη σπόρων κάτω από συνθήκες καταπόνησης με υπερέκφραση του ισοενζύμου *ZmGST27* από αραβόσιτο (Roxas *et al.*, 1997, 2000). Σε ένα άλλο παράδειγμα, τροποποιήθηκαν γενετικά φυτά βαμβακιού ώστε να εκφράζουν το ισοένζυμο του καπνού *GSTNt107* (Ginger *et al.*, 2005). Το γονίδιο *PjGST* από το φυτό *Prosopis juliflora* έχει μελετηθεί διεξοδικά εξαιτίας της ανοχής που προσδίδει σε διαγονιδικά φυτά ρυζιού και καπνού υπό συνθήκες αβιοτικού στρες (υψηλή αλατότητα και ξηρασία) (Parida and Ferorge, 2007).

Τα επιτεύγματα σήμερα στη γεωργική βιοτεχνολογία έχουν ξεπεράσει ήδη όλες τις προηγούμενες προσδοκίες. Η πλήρης υλοποίηση και ο αντίκτυπος των νέων εξελίξεων δεν εξαρτάται μόνο από τις συνεχείς επιτυχίες και καινοτόμες δραστηριότητες έρευνας και ανάπτυξης, αλλά και από την αποδοχή του κοινού (Barrows *et al.*, 2014; Holaskova *et al.*, 2015).

1.10.2 Ιατρική βιοτεχνολογία

Στην ιατρική, οι GSTs βρίσκουν εφαρμογή σε τρεις διαφορετικές περιοχές: ως μοριακοί στόχοι για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων και προφαρμάκων (Sau *et al.*, 2010; Perperopoulou *et al.*, 2014; Ramsay and Dilda, 2014; Sharma and

Chakrapani, 2014; Pouliou *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2017) ως γενετικοί διαγνωστικοί δείκτες για ένα ευρύ φάσμα διαταραχών ή ως εργαλεία παροχής φαρμάκων (Karpusas *et al.*, 2013; Schnekenburger *et al.*, 2014; Joyce *et al.*, 2015). Ορισμένα ένζυμα χρησιμοποιούνται ως ανοσοϊστολογικοί δείκτες για πολλούς τύπους καρκίνου καθώς και η αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών συνδέεται με τη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου και τον εντοπισμό προκαρκινικών κυτταρικών βλαβών (Habdous *et al.*, 2002). Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες διερευνούν τη σχέση μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (Conolo *et al.*, 2008). Βρέθηκε, μάλιστα, ότι πολυμορφισμοί σε ανθρώπινα γονίδια συνδέονται με τον τρόπο αντίδρασης του οργανισμού στη θεραπεία κατά του καρκίνου (Sweeney *et al.*, 2003; Yoshiga and Soya 2005; Keller *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2009).

Οι παραλλαγές αυτές των GSTs θα βοηθήσουν στο μέλλον για την επιλογή της καλύτερης εξατομικευμένης θεραπείας για διάφορους τύπους καρκίνου (Sweeney *et al.*, 2003; Oldenburg *et al.*, 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αλλοένζυμο GSTP1 105Val το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των ασθενών σε προχωρημένα στάδια καρκίνου του παχέος εντέρου που λαμβάνουν συνδυασμένη χημειοθεραπεία (Stoehlmacheret *et al.*, 2002). Οι GSTs δεν σχετίζονται μόνο με τον καρκίνο. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων της *pi* και *alpha* τάξης φαίνεται να συνδέονται επίσης με ασθένειες στο συκώτι και στους νεφρούς (Sundberg *et al.*, 1994). Οι GSTs της *omega* τάξης εμφανίζουν ένα μοναδικό εύρος ενζυμικών ιδιοτήτων σε σύγκριση με άλλες GSTs. Το ισοένζυμο GSTO1-1 εμφανίζει δράση διυδροασκορβικού οξέος και θειολτρανσφεράσης (Board *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006). Επίσης, η δράση του GSTO1-1 έχει συνδεθεί με την ηλικία εμφάνισης του Αλτσχάιμερ και του Πάρκινσον (Li *et al.*, 2006). Στην περίπτωση αυτή, ο ρόλος του ενζύμου στη μείωση του διυδροασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο μπορεί να σχετίζεται με την ηλικία εμφάνισης των δύο ασθενειών (Allen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

1.10.2.1 Εφαρμογές των GSTs στη μοριακή διαγνωστική διαφόρων τύπων καρκίνου

Λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων της GSH και των μεταβαλλόμενων επιπέδων έκφρασης των GSTs στα καρκινικά κύτταρα και τους όγκους (Mannervic *et al.*, 1988), οι GSTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς στη διάγνωση και την κλινική παρακολούθηση του καρκίνου. Παραδείγματος χάρη, σε πολλούς όγκους έχουν βρεθεί

αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου GSTP1-1 σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, γύρω από την περιοχή εμφάνισης του όγκου (Kelley *et al.*, 1994) και σε ασθενείς με γλοϊώμα (Ali-Osman *et al.*, 1998) και καρκίνο του στομάχου (Fan, 1995), έχει παρατηρηθεί αύξηση του επιπέδου έκφρασης της GSTP1-1 με την εξέλιξη του όγκου, ενώ άλλες GSTs μπορεί να εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η έκφραση του ενζύμου GSTP1-1 στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου μαστού, μειώνεται προοδευτικά όσο το φυσιολογικό επιθήλιο αποδιαφοροποιείται σε προνεοπλασματικές και νεοπλασματικές αλλοιώσεις. Τέτοιου είδους ρύθμιση της GSTP1-1 διακρίνεται κυρίως στον καρκίνο του προστάτη (Josephy and Mannervic, 2006). Μελέτες έχουν δείξει πως, η GSTP1-1 μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο ανοσοιστολογικό δείκτη για διάφορους τύπους κακοήθειας, καθώς η έκφρασή της αυξάνεται σε προ-νεοπλασματικό επίπεδο αλλά και σε κακοήθεις όγκους.

1.10.2.2 Πολυμορφισμοί των GSTs και συσχέτιση με τον καρκίνο

Έχουν παρατηρηθεί ποικίλοι γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των GSTs. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες, στις οποίες λαμβάνεται υπόψη το γενετικό προφίλ των ασθενών, ερευνούν τη συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών, όπως ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Conolo *et al.*, 2008). Σε πρόσφατες δοκιμές, έχει χρησιμοποιηθεί η υψηλής ανάλυσης τεχνική της PCR για τον χαρακτηρισμό του γενετικού προφίλ, που επιτρέπει το γρήγορο και ακριβή χαρακτηρισμό των κληρονομούμενων αλληλομόρφων των πολυμορφικών GST γονιδίων κυρίως των τάξεων *alpha*, *mu*, *pi* και *theta* (GSTM1, GSTM3, GSTP1 και GSTT1) (Nunes, 2006; Keller, 2006). Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί των ανθρώπινων GST γονιδίων οφείλονται κυρίως σε διαφορές σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) και πιο σπάνια σε μεταλλάξεις εξαλείψεως (Ali-Osman, 2007).

Η επιστήμη της φαρμακογονιδιωματικής, εστιάζει το ενδιαφέρον της στο χαρακτηρισμό γονιδιωματικών διαφορών (π.χ. πολυμορφισμοί ή διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων) που σχετίζονται με τη διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών στα φάρμακα. Βασίζεται στα SNPs (Sun *et al.*, 2010) και πιθανολογείται ότι είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και των γονιδίων των μεταφορέων των φαρμάκων. Μπορεί να μεταβάλλουν την έκφρασή τους ή τη δραστηρότητά τους, επηρεάζοντας έτσι τη διάθεσή τους στον οργανισμό και τα

αποτελέσματα της χημειοθεραπείας (Bernig and Chanock, 2006). Παράδειγμα αποτελεί ο αλληλόμορφος GSTP1*1C, ο οποίος φαίνεται να λειτουργεί πιο προστατευτικά για το κύτταρο ως προς τα φαρμακευτικά σκευάσματα cisplatin και carboplatin, συγκρινόμενος με τους αλληλόμορφους GSTP1*A και GSTP1*B (Ishimoto and Ali-Osman, 2002). Επίσης, σε ασθενείς που έπασχαν από οξεία και χρόνια μυελίτιδα, λευχαιμία, γλοίωμα, πολλαπλό μυέλωμα, λέμφωμα Hodgkin και καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, του οισοφάγου και του στομάχου, εντοπίστηκαν οι αλληλογράφοι GSTP1*B και GSTP1*C και παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και εμφάνισαν μεγαλύτερο χρόνο ίασης, σε σχέση με άλλους ασθενείς χωρίς τους συγκεκριμένους αλληλομόρφους (Allan *et al.*, 2001; Goekkurt *et al.*, 2006).

Η γενετική σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού των GSTs και της ευαισθησίας σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου έχει συζητηθεί σε πρόσφατες δημοσιευμένες έρευνες. Μερικά πρόσφατα παραδείγματα περιλαμβάνουν: καρκίνο του μαστού (Hu *et al.*, 2016, Akhtar *et al.*, 2016), καρκίνο του οισοφάγου (Lu *et al.*, 2016), καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Safarinejad *et al.*, 2013), οξεία μυελοειδή λευχαιμία (Xiao *et al.*, 2014), καρκίνο του γαστρεντερικού σωλήνα (Meng *et al.*, 2014) και καρκίνο του προστάτη (Zhou *et al.*, 2014a). Επιπλέον, στοιχεία από πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες πρότειναν τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών των ανθρώπινων GST γονιδίων με μια σειρά άλλων διαταραχών, όπως η μεταβολική δυσλειτουργία και η παχυσαρκία (Picklo *et al.*, 2015), η διαβητική νεφροπάθεια (Tesauro *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017), οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, η ασθένεια Parkinson (Mazzetti *et al.*, 2015; Board and Menon, 2016; Wang *et al.*, 2016), η σχιζοφρένεια (Kim *et al.*, 2015), ο σχετιζόμενος με την ηλικία καταρράκτης (Liao *et al.*, 2015), η στεφανιαία νόσος (Zhou *et al.*, 2014b), οι αναπνευστικές παθήσεις και οι αλλεργίες (Bowatte *et al.*, 2016).

Αντίστοιχοι πολυμορφισμοί, οι οποίοι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου GST, έχουν περιγραφεί και για τα γονίδια των GSTT1 και GSTM1 (London *et al.*, 2000). Στοιχεία υποστηρίζουν πως, ο πολυμορφισμός της GSTM1 σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, καθώς, σε περιπτώσεις παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Hall *et al.*, 2004) και καρκίνου των ωοθηκών (Howells *et al.*, 2001), ο γονότυπος GSTM1*0 σχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία σε σχέση με τους γονότυπους GSTM1*A και GSTM1*B (Hall *et al.*,

2004). Επιπλέον, ο αλληλόμορφος GSTT1*0 θεωρείται ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία και στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Άτομα με τον γονότυπο GSTT1*0 θεωρούνται άτομα με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, μηνιγγιώματος, οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας και καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων (Salagonic *et al.*, 1999).

1.10.2.3 Οι GSTs ως μοριακοί στόχοι σχεδιασμού φαρμάκων

Οι GSTs εμπλέκονται σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την αποτοξίνωση των κυττάρων του οργανισμού, είναι όμως υπεύθυνες και για την ενεργοποίηση της τοξικότητας ορισμένων ουσιών. Συνεπώς, λόγω αυτής της ιδιότητάς τους, αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων έναντι της GST. Η GSTP1-1 που κυρίως υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, με άμεση συνέπεια να εμφανίζουν έντονη χημειοανθεκτικότητα, αποτελεί ένα σημαντικό μοριακό στόχο για την ενεργοποίηση των προφαρμάκων.

Ένα παράδειγμα αποτελεί η αζαθειοπρίνη, ένα προφάρμακο το οποίο λειτουργεί ανοσοκατασταλτικά. Συγκεκριμένα, σε δοκιμή μελετήθηκαν δεκατέσσερις hGSTs για τη δραστηριότητά τους στην κατάλυση αυτής της αντίδρασης και η *alpha* τάξη παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η GSTA2-2 είχε τη μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα, ενώ η GSTA1-1 παρουσίαζε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα καταλυτική δραστηριότητα με την αζαθειοπρίνη (Eklund *et al.*, 2006).

Πολλά φάρμακα και προφάρμακα έχουν αναφερθεί να παρουσιάζουν αξιόλογη αναστολή έναντι των διαφόρων GSTs και προτείνονται ως αποτελεσματικοί αναστολείς για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων (Sau *et al.*, 2010, Mahajan and Atkins, 2005). Το αιθακρινικό οξύ είναι ένας από τους πρώτους αναστολείς της GST, που χρησιμοποιήθηκε για να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στα κυτταροτοξικά αποτελέσματα των χημικοθεραπευτικών φαρμάκων (Tew *et al.*, 1997). Παράγωγα του αιθακρινικού οξέος (Yang *et al.*, 2010), παράγωγα ξανθονών (Zoi *et al.*, 2013), παράγωγα πύρρολο-σουλφόνυλο-αδρυλιμινών (Koutsoumbli *et al.*, 2012) καθώς και παράγωγα των προσταγλαδινών (6,9-deepoxy-6,9-(phenylimino)- $\Delta^{6,8}$ -prostaglandin I₁) (Tew *et al.*, 1988) αλλά και αρκετά μόρια προφαρμάκων (Pezzola *et al.*, 2010, Johansson *et al.*, 2011) έχουν μελετηθεί ως πιθανοί αναστολείς των GSTs.

Επίσης, ο σχεδιασμός νέων πεπτιδικών αναλόγων της GSH αποτελεί σημαντική στρατηγική ανάπτυξης νέων αναστολέων για τις GSTs και έχει αποδώσει αξιοσημείωτα αποτελέσματα (Mahajan and Atkins, 2005; Rouliou *et al.*, 2017).

1.10.3 Αναλυτική βιοτεχνολογία

Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν τη σύζευξη της GSH με ένα ευρύ φάσμα ξενοβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών φαρμάκων, παρασιτοκτόνων ή περιβαλλοντικών ρύπων έχει διερευνηθεί για την κατασκευή βιοαισθητήρων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τέτοιων ενώσεων. Η αρχή της λειτουργίας βασίζεται στη μέτρηση των απελευθερωμένων πρωτονίων ή ιόντων αλογόνου από την αντίδραση της GSH με την ξενοβιοτική αντίδραση (Chronopoulou and Labrou, 2009; Morou *et al.*, 2010; Maia and Nadvorny, 2014). Ένα άλλο σύστημα ανίχνευσης ερευνά τη λειτουργία των δεσμευτών των GSTs και ειδικότερα την ικανότητα του ξενοβιοτικού-στόχου να αναστέλλει την αντίδραση του CDNB με τη GSH (Karoli *et al.*, 2008, Chronopoulou *et al.*, 2012). Οπτικοί βιοαισθητήρες που βασίζονται στις GSTs, είναι κατασκευασμένοι να ανιχνεύουν μια ποικιλία φυτοφαρμάκων όπως το μαλάθειο (Karoli *et al.*, 2008), τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Dowd *et al.*, 2010), την ατραζίνη (Andreou and Clonis, 2002), το καπτάν (Singh *et al.*, 2009, Choi *et al.*, 2003), κ.ά.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεταλλαγμένη Gln53Ala της GST I της *phi* τάξης από το φυτό *Zea mays* όπου πραγματοποιήθηκε έρευνα για την ανάπτυξη ενός ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα για τις μετρήσεις του μαλάθειου σε νερό (Karoli *et al.*, 2008). Επίσης, ο Oliveira και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα βασισμένο σε GST για τον ποσοτικό προσδιορισμό του molinate σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού (Oliveira *et al.*, 2013). Ο Peri-Naor και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ένα ισοένζυμο GST για τον σχεδιασμό ενός συνθετικού «χημικού μετατροπέα» που επιτρέπει τον *in vitro* έλεγχο της επικοινωνίας μεταξύ των πρωτεϊνών του αυξητικού παράγοντα και της καταλυτικής δραστηριότητας της GST. Η δραστηριότητα της GST ρυθμίζεται από ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν την ενζυμική αντίδραση (Peri-Naor *et al.*, 2015). Σε μια άλλη μελέτη, ο Selvakumar και οι συνεργάτες του σχεδίασαν ένα τεχνητό υποδοχέα βασισμένο σε ένζυμο που έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει διαφορετικά μέλη της οικογένειας των

GSTs, επιτρέποντας τη διάκριση μεταξύ δομικά παρόμοιων ισοενζύμων (Selvakumar *et al.*, 2015).

1.10.4 Νανοβιοτεχνολογία

Οι GSTs κερδίζουν τις εντυπώσεις ολοένα και περισσότερο στον τομέα της νανοβιοτεχνολογίας ως δομικό στοιχείο για την κατασκευή νανοβιοαισθητήρων και νανοδομών όπως οι νανοσωλήνες και τα νανοσωματίδια (Vello *et al.*, 2017). Αυτά τα νέα νανοϋλικά είναι σε θέση να προσφέρουν ειδικές ιδιότητες και εναλλακτικές λύσεις σε κλασικά προβλήματα, όπως το πολύ μικρό μέγεθος, η ευκολία στη χρήση και το χαμηλό κόστος. Για παράδειγμα, κατασκευάστηκε ένας κβαντικός νανοβιοαισθητήρας με βάση το FRET προκειμένου να ανιχνευθεί το παθογόνο *Polymyxa betae* χρησιμοποιώντας ένα GST ισοένζυμο (Safarpour *et al.*, 2012). Επίσης, ο Bai και οι συνεργάτες του πέτυχαν μια *de novo* στρατηγική για τον έλεγχο του προσανατολισμού του GST ισοενζύμου από *Schistosoma japonica* (SjGST) σε πρωτεΐνες νανοϋλικών (Liang *et al.*, 2013).

Οι GSTs δεν χρησιμοποιούνται μόνο ως ανιχνευτές αλλά επίσης και ως μέσω για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σύντηξης (Jung *et al.*, 2006; Ha *et al.*, 2007; Yuk *et al.*, 2008). Η Saatçi και οι συνεργάτες της κατασκεύασαν έναν βιοαισθητήρα, που βασίζεται σε δύο διαφορετικούς τύπους GSTs, προκειμένου να ανιχνεύσει βαρέα μέταλλα (Zn^{2+} και Cd^{2+}). Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε ακινητοποιώντας την πρωτεΐνη στην επιφάνεια του χρυσού (Saatçi *et al.*, 2007). Οι ιδιότητες των GSTs τους δίνουν την ευκαιρία να χρησιμοποιηθούν και για την κατασκευή νανοδομών. Για παράδειγμα, ο Bai και οι συνεργάτες του κατάφεραν να ελέγξουν τον προσανατολισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το ShGST-2His ως δομικό στοιχείο και το Ni^{2+} ως χηλικό μεταλλικό ιόν για να κατασκευάσουν μια νανοδομή (Bai *et al.*, 2013). Επιπλέον, και ο Zhang με την ομάδα του χρησιμοποίησαν ShGST-6His και ιόντα Ni για τη δημιουργία νανοσωματιδίων (Zhang *et al.*, 2012).

1.10.5 Βιοτεχνολογία περιβάλλοντος

Η ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με τα ξενοβιοτικά μεταβολικά ένζυμα έχει μεγάλες δυνατότητες για τη διαχείριση και την αποκατάσταση περιβαλλοντικών ρύπων (Dixit *et al.*, 2011; Gunning *et al.*, 2014; Tzafestas *et al.*, 2017; Chatzikonstantinou *et al.*,

2017). Για παράδειγμα, η έκφραση ενός GST ισοεζύμου από τη δροσόφιλα στο *Arabidopsis thaliana* παρέχει την ικανότητα να αποτοξινώνει περιβαλλοντικούς ρύπους καθώς και το εκρηκτικό 2,4,6-τρινιτροτολουόλιο (Tzafestas *et al.*, 2017). Ομοίως, η έκφραση ενός GST ισοενζύμου από μύκητα σε διαγονιδιακά φυτά καπνού προσδίδει την ικανότητα αποτοξίνωσης του ανθρακενίου (Dixit *et al.*, 2011).

1.10.5.1 Μέθοδος βιοεξυγίανσης για την αποικοδόμηση ανθεκτικών περιβαλλοντικών ρύπων

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

1.10.5.2 Ανάπτυξη βιοαισθητήρων

Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν αντιδράσεις δέσμευσης της GSH με ξενοβιοτικές ενώσεις, βοήθησε σημαντικά την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων. Παραδείγματος χάρη, το ισοένζυμο hGST1-1 από τον αραβόσιτο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη φορητού βιοαισθητήρα οπτικής ίνας, για τον προσδιορισμό του φυτοπροστατευτικού προϊόντος atrazine (Andreou and Clonis, 2002). Ο Choi και οι συνεργάτες τους έχουν αναπτύξει έναν οπτικό βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του captan με βάση την αναστολή ενός GST ισοενζύμου από ανθρώπινο πλακούντα (Choi *et al.*, 2003a). Επίσης, έχει δημιουργηθεί ένας οπτικός βιοαισθητήρας βασισμένος στην αναστολή τόσο της GST όσο και της AChE για την ανίχνευση captan και οργανοφωσφορικών ενώσεων αντίστοιχα (Choi *et al.*, 2003b). Από την άλλη πλευρά, ο Oliveira και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν έναν βιοαισθητήρα με βάση μια GST, προκειμένου να προσδιορίσουν το molinate σε υδάτινα περιβαλλοντικά δείγματα (Oliveira *et al.*, 2013). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μετάλλαξη Gln53Ala της GSTI από αραβόσιτο οδήγησε σε αύξηση της αναστολής του εντομοκτόνου malathion κατά 9,2-φορές σε σύγκριση με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Η μεταλλαγμένη μορφή

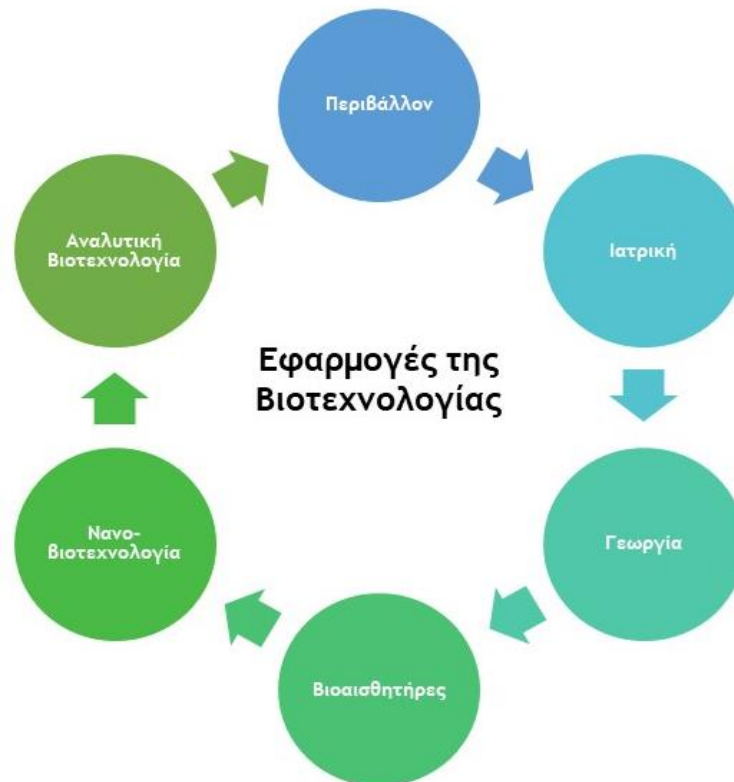
χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου εντομοκτόνου (Karoli *et al.*, 2008).

Η έρευνα στον τομέα αυτό δεν αφορά μόνο τα φυτοφάρμακα και το περιβάλλον. Άλλη μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η μελέτη του βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ακρυλαμίδης σε αμυλούχα τρόφιμα (Hasegawa *et al.*, 2007). Η ακρυλαμίδα θεωρείται επικίνδυνη ουσία για την ανθρώπινη υγεία και είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη μιας γρήγορης και οικονομικής μεθόδου ανίχνευσής της. Επίσης, αναπτυχθήκαν βιοαισθητήρες για την ανάλυση ηπατονεοπλασματικών και προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων, χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει μια GST και συνεκτιμά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της 2-μακρογλοβουλίνης (Sugata *et al.*, 2005). Συνεπώς, είναι δυνατός ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη βιοαισθητήρων με ιατρικές εφαρμογές.

1.10.5.3 Οι GSTs ως εργαλείο αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης ξενοβιοτικών

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

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



Σχήμα 1.8: Εφαρμογές της βιοτεχνολογίας.

1.11 Κινητική ενζύμων

Αντικείμενο της κινητικής των ενζύμων είναι η μελέτη του ρυθμού της αντιδράσης ή της ταχύτητας αντιδράσης, και των παραγόντων που την επηρεάζουν (Kou *et al.*, 2005). Σε κάθε περίπτωση, η ταχύτητα (u) μιας αντιδράσης, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή (t), ισούται με την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης της ταχύτητας έναντι του χρόνου την αντίστοιχη χρονική στιγμή. Η ταχύτητα παραμένει σταθερή για ένα μικρό χρονικό διάστημα στην αρχή της αντιδράσης, κατά το οποίο παρατηρείται γραμμική σχέση μεταξύ της μεταβολής φ , της συγκεντρώσεως και του χρόνου. Η ταχύτητα που αντιστοιχεί στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης ονομάζεται αρχική ταχύτητα αντιδράσης (u_0) και ισούται με τη κλίση της ευθείας (Roger and Kenneth, 2013). Αυτό συμβαίνει διότι καθώς η αντίδραση εξελίσσεται και τα αντιδρώντα (υποστρώματα) μετατρέπονται σε προϊόντα, η ταχύτητα μειώνεται όσο μειώνεται η συγκέντρωση των αντιδρώντων ή αυξάνεται η συγκέντρωση των προϊόντων, και τελικά μηδενίζεται. Στο σημείο αυτό, είτε τα αντιδρώντα μετατράπηκαν σε προϊόντα, είτε η αντίδραση έφτασε στο σημείο ισορροπίας, οπότε η ταχύτητα αντίδρασης προς τη μία κατεύθυνση ισούται

με την ταχύτητα προς την αντίθετη κατεύθυνση (Qian and Elson, 2002; Kou *et al.*, 2005; Butterworth *et al.*, 2012).

Επίσης διαπιστώθηκε ότι η γραφική παράσταση της ταχύτητας u_0 συναρτήσει της αρχικής συγκεντρώσεως $[S_0]$ για όλα τα ένζυμα, εκτός εκείνων που εμφανίζουν αλλοστερικά και συνεργιστικά φαινόμενα, ακολουθεί ορθογώνια υπερβολή και ως τέτοια ικανοποιεί τη σχέση:

$$u_0 = \alpha [S_0] / [S_0] + \beta \quad (1.1)$$

Όπου: α και β σταθερές, με α ίση προς τη μέγιστη τιμή της u_0 (V_{\max}) και β ίση προς την τιμή $[S_0]/2$, για την οποία $u_0 = V_{\max} / 2$. Για όλα τα ένζυμα η αύξηση της συγκεντρώσεως του υποστρώματος, για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου, τελικά οδηγεί σε επίτευξη μέγιστης ταχύτητας αντιδράσεως, V_{\max} (Kou *et al.*, 2005; Kenneth and Roger, 2011).

Οι *Brown* και *Henri* θα έπρεπε να θεωρηθούν ως οι θεμελιωτές της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων, ωστόσο οι *Michaelis* και *Menten* είναι αυτοί που σήμερα αναγνωρίζονται ως τέτοιοι. Οι τελευταίοι βασίζόμενοι στην πρόταση του *Brown* περί σχηματισμού συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και στο μαθηματικό πρότυπο του *Henri*, δέχονται ότι σε μια ενζυμική αντίδραση που συμμετέχει το υπόστρωμα (S) και αλληλεπιδρά με το ένζυμο (E), το πρώτο στάδιο αποτελεί απλώς ένα στάδιο ισορροπίας το οποίο επιτυγχάνεται ταχύτατα και στο οποίο σχηματίζεται το σύμπλοκο ES και ελέγχεται από τη σταθερά διασπάσεως, K_D . Ως δεύτερο και βραδύτερο στάδιο θεωρούν τη μετατροπή του δεσμευμένου στο ένζυμο υποστρώματος σε προϊόν (P), αντίδραση που ελέγχεται από τη σταθερά ταχύτητας, k_{cat} , και συνδέονται από επανάκτηση του ενζύμου σε ελεύθερη μορφή (Qian and Elson, 2002; Butterworth *et al.*, 2012).

Συνεπώς, συνολικά ισχύει ότι:



Όπου:

K_D : σταθερά διασπάσεως του συμπλόκου ES

k_{cat} : σταθερά ταχύτητας καταλύσεως

Η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου ισούται με το άθροισμα της συγκέντρωσης του ελεύθερου ενζύμου συν τη συγκέντρωση του συμπλοκοποιημένου ενζύμου. Έτσι, έχουμε

$$[ES] = [E_0] [S] / (K_D + [S]) \quad (1.3)$$

Η καταλυτική μετατροπή που πραγματοποιείται στο δεύτερο στάδιο έχει ταχύτητα U , η οποία καθορίζει και την ταχύτητα του συνολικού φαινομένου, των δύο σταδίων. Επειδή η αντίδραση είναι πρώτης τάξεως ισχύει ότι:

$$U = k_{cat} [ES] \quad (1.4)$$

Συνδυάζοντας λοιπόν τις δύο παραπάνω σχέσεις (1.3 και 1.4) προκύπτει ότι:

$$U = k_{cat} [E_0] [S] / K_D + [S] \quad (1.5)$$

Η παραπάνω εξίσωση είναι γνωστή ως εξίσωση *Michaelis Menten* (Butterworth *et al.*, 2012; Roger and Kenneth, 2013).

1.11.1 Η σημασία της εξίσωσης των *Michaelis Menten*

Προϋποθέσεις για την ισχύ της εξίσωσης

Για να ισχύει η προηγούμενη σχέση θα πρέπει η ενζυμική αντίδραση να είναι μονο-υποστρωματική, δηλαδή κάθε μόριο ενζύμου να φέρει μία περιοχή δέσμευσης υποστρώματος και κατά την αντίδραση να σχηματίζεται μόνο ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES) (Kou *et al.*, 2005; Kenneth and Roger, 2011).

Η καταλυτική σταθερά K_{cat}

Η γενική έννοια της k_{cat} γίνεται κατανοητή από το γεγονός ότι ονομάζεται και *αριθμός μετατροπής* και ισούται με τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που καταλύονται σε προϊόν από ένα ενζυμικό μόριο ανά μονάδα χρόνου. Οι τιμές της k_{cat} κυμαίνονται από πολύ χαμηλές έως πολύ υψηλές. Η αντίστροφη τιμή της k_{cat} ($1/k_{cat}$) ισούται με το χρόνο που απαιτείται προκειμένου να καταλυθεί ένα μόριο υποστρώματος (Qian and Elson, 2002; Roger and Kenneth, 2013).

Η σταθερά Michaelis (K_m)

Η σταθερά Michaelis (K_m) είναι το μέγεθος $(k_1+k_2)/k_1$ και προσδιορίζει τις σχετικές συγκεντρώσεις των E, S και ES σε συνθήκες σταθεροποιημένης κατάστασης και όχι ισορροπίας (Butterworth *et al.*, 2012).

Η μέγιστη ταχύτητα (V_{max})

Εάν η συγκέντρωση του υποστρώματος, [S], στην οποία καλείται να λειτουργήσει το ένζυμο είναι πολύ μεγαλύτερη της K_m , η σχέση γίνεται:

$$U = k_3 [E_0] \quad (1.6)$$

και αντιστοιχεί σε αντίδραση μηδενικής τάξης, ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S]. Στην περίπτωση αυτή, η ταχύτητα ταυτίζεται με τη μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , ή με την οριακή ταχύτητα. Έτσι προκύπτει ότι η V_{max} εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου, ικανοποιώντας αντίδραση πρώτης τάξης και συνεπώς η V_{max} δεν αποτελεί σταθερά, όπως η K_m .

Η σταθερά εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m ή K_A)

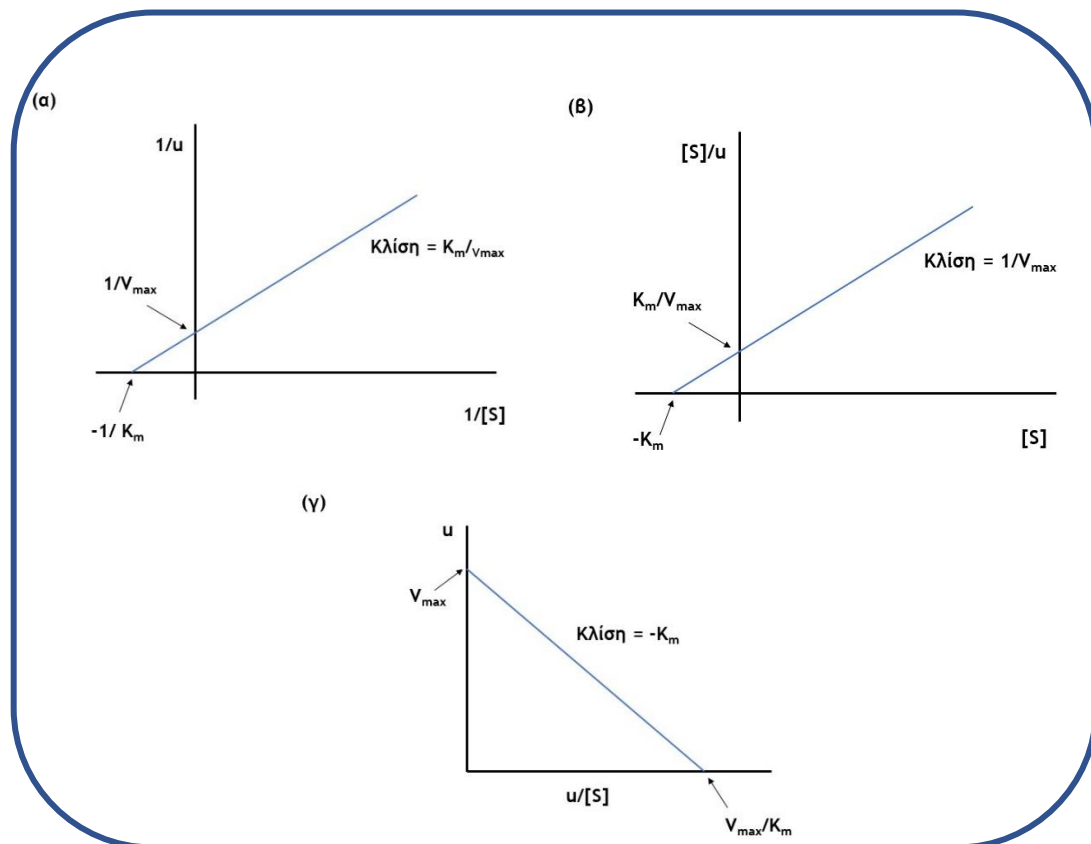
Ο λόγος των δύο σταθερών k_{cat}/K_m συμβολίζεται με K_A , προσδιορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου και ονομάζεται *σταθερά εξειδίκευσης*. Η τιμή της σταθεράς αυτής είναι ο πλέον αξιόπιστος τρόπος εκτίμησης της εξειδίκευσης ενός ενζύμου για διάφορα υποστρώματα. Η εξειδίκευση είναι το αποτέλεσμα διαφορών μεταξύ των μεταβατικών καταστάσεων των υποστρωμάτων και λιγότερο μεταξύ των αλληλεπιδράσεων των αρχικών καταστάσεων που εμπεριέχονται στην K_m . Η K_A συνεκτιμά και τις δύο σταθερές για κάθε υπόστρωμα (Roger and Kenneth, 2013).

Η κλασική γραφική παράσταση των *Michaelis Menten*, ως προς τις μεταβλητές ταχύτητα και υπόστρωμα, οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή. Υπάρχουν και εναλλακτικές μορφές προσδιορισμού των K_m και V_{max} μέσω άλλων εξισώσεων, όπως η γραφική παράσταση των *Lineweaver–Burk* (Εικόνα 1.9α), η γραφική παράσταση του *Hanes* (Εικόνα 1.9β) και η γραφική παράσταση του *Hofstee* (Εικόνα 1.9γ).

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

$$\frac{1}{u} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.7)$$

Η γραφική παράσταση της παραπάνω σχέσης είναι μία ευθεία η οποία προκύπτει αν παραστήσουμε γραφικά στον άξονα των τεταγμένων τις τιμές $1/u$ και στον άξονα των τετημένων τις τιμές $1/[S]$ (Σχήμα 1.9α) (Κου *et al.*, 2005). Πρέπει να προσέξουμε τα πειραματικά σφάλματα, τα οποία μεγεθύνονται στις αντίστροφες τιμές και την επιλογή των τιμών $[S]$ ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στον άξονα των τετημένων (Κλώνης, 2007). Πρέπει, επίσης, να σημειώσουμε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση ενζύμου (Kenneth and Roger, 2011).



Εικόνα 1.9: Γραφικές παραστάσεις για τον υπολογισμό των K_{\max} και V_{\max} (Κλώνης, 2007). (α) Διπλών αντιστρόφων ή των *Lineweaver-Burk*. (β) Γραφική παράσταση του *Hanes*. (γ) Γραφική παράσταση του *Hofstee*.

1.12 Αναστολή της ενζυμικής αντίδρασης

Ενώσεις οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζονται αναστολείς ή παρεμποδιστές και το φαινόμενο ονομάζεται αναστολή ή παρεμπόδιση. Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και σε μη-αντιστρεπτούς.

Μια αναστολή λέγεται *αντιστρεπτή* όταν αποκαθίσταται η ισορροπία στην αντίδραση $E + I \leftrightarrow EI$ που μπορεί να μετακινηθεί προς τα δεξιά ή αριστερά. Οι δεσμοί σύνδεσης του ενζύμου (E) με τον αναστολέα (I), είναι ασθενείς και υπάρχει κάποια σταθερά αστάθειας (K_i), που αποτελεί και το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου με τον αναστολέα (Nuhoglu and Yalcin, 2005).

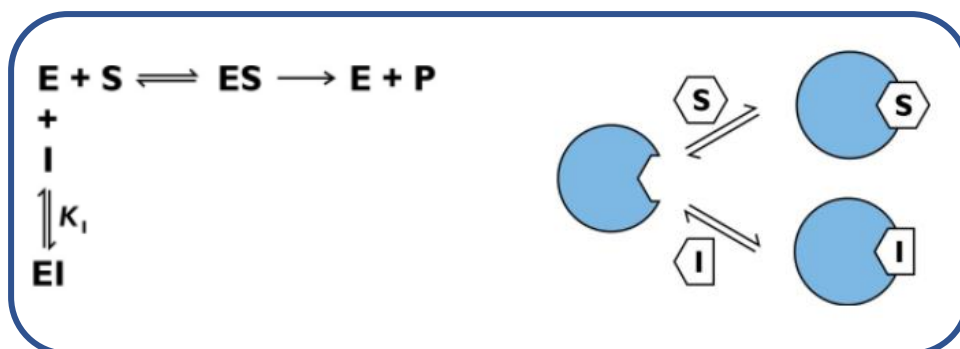
Μια αναστολή λέγεται *μη αντιστρεπτή* όταν οι δεσμοί του ενζύμου και του αναστολέα είναι σταθεροί και η αντίδραση είναι μόνιμα μετατοπισμένη προς τα δεξιά (δηλαδή $E + I \rightarrow EI$). Υπάρχει μια σταθερά ταχύτητας (K), που δηλώνει το κλάσμα του ενζύμου που αναστέλλεται σε ορισμένη χρονική περίοδο και από ορισμένη συγκέντρωση αναστολέα. Οι μη-αντιστρεπτοί αναστολείς ονομάζονται και *αδρανοποιητές* (Cornish-Bowden, 2012).

Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στη κινητική των *Michaelis Menten*, όπως απουσία αναστολέα, με τη διαφορά ότι για τις σταθερές εξειδικεύσης K_A και καταλύσης k_3 διαμορφώνονται νέες τιμές, οι ονομαζόμενες φαινομενικές τιμές, K_A^{app} και k_3^{app} , οι οποίες μεταβάλλονται συναρτήσει της συγκεντρώσεως του αναστολέα [I]. Η έννοια των φαινομενικών τιμών επεκτείνεται και στη σταθερά των *Michaelis Menten* και στη μέγιστη ταχύτητα, K_m^{app} και V_{max}^{app} , αντιστοίχως (Knecht and Löffler, 2000).

Τα κύρια είδη της ενζυμικής αναστολής είναι τρία, η συναγωνιστική αναστολή, κατά την οποία επηρεάζεται η σταθερά εξειδικεύσης K_A ενώ παραμένει ανέπαφη η σταθερά καταλύσης k_3 , η ανταγωνιστική αναστολή, κατά την οποία παραμένει ανέπαφη η K_A ενώ επηρεάζεται η k_3 , και η μικτή αναστολή, κατά την οποία επηρεάζονται αμφότερες οι K_A και k_3 (Cornish-Bowden, 2012).

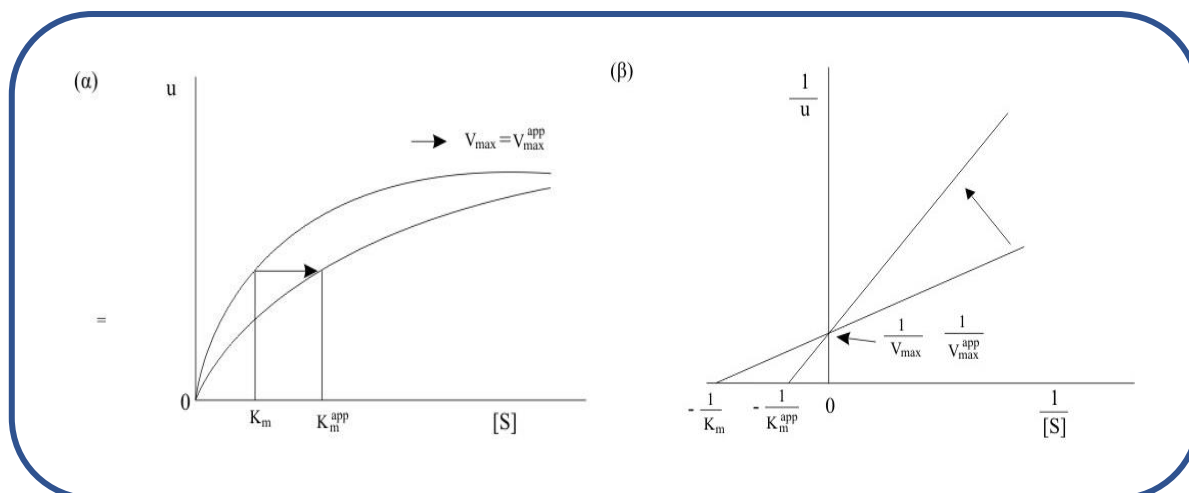
1.12.1 Συναγωνιστική αναστολή

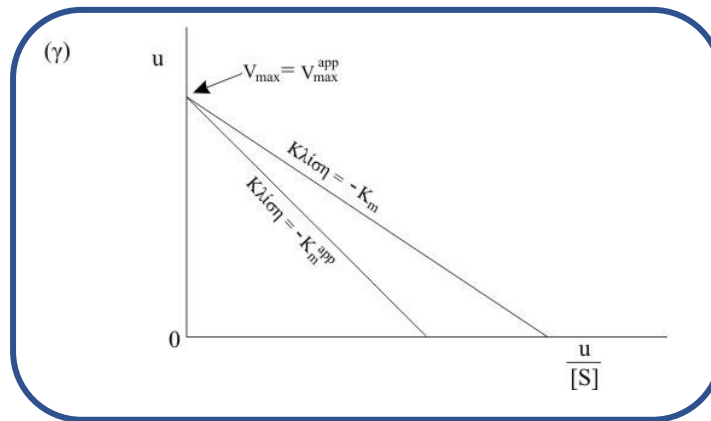
Ο αναστολέας και το υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο, έτσι ώστε η δέσμευση του ενός να αποκλείει τη δέσμευση του άλλου. Το πρότυπο ισορροπίας της συναγωνιστικής αναστολής είναι το ακόλουθο:



Όπου E είναι το ένζυμο, I ο αναστολέας, S το υπόστρωμα και K_i η σταθερά της συναγωνιστικής αναστολής και ισούται με $[E][I] / [EI]$.

Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, ο υπολογισμός της K_i μπορεί να πραγματοποιηθεί γραφικώς, με δεδομένα της γραφικής απεικόνισης *Lineweaver-Burk* (Εικόνα 1.10). Ειδικότερα, από τις κλίσεις των ευθειών που σχηματίζουν οι διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα, μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα δευτερογενές γράφημα κλίσεων έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων αναστολέα ($[I]$). Αυτό το δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει ευθεία γραμμή, εάν έχουμε *καθαρά συναγωνιστική αναστολή*, και το σημείο τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα του δευτερογενούς γραφήματος ισούται με $-K_i$ (Nuhoglu and Yalcin, 2005; Kim and Uyama, 2005; Cornish-Bowden, 2012).



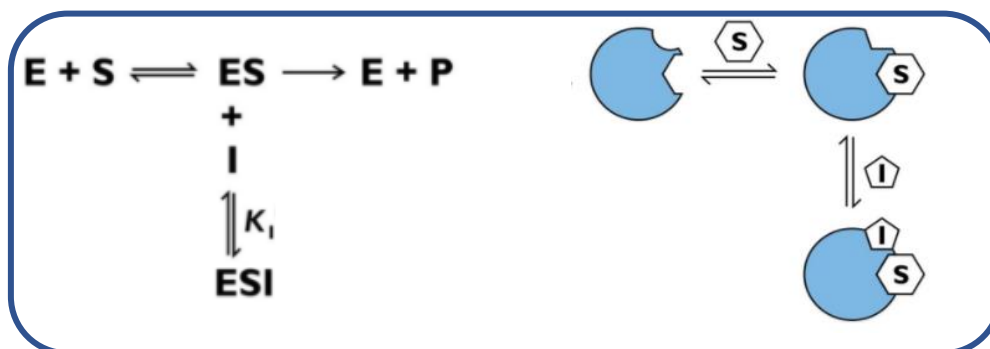


Εικόνα 1.10: Συναγωνιστική αναστολή. Γραφική παράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (u) συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος $[S]$ απουσία και παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα. (α) Κλασική *Michaelis Menten* (ορθογώνια υπερβολή), (β) δίπλων αντιστρόφων (ευθεία) και (γ) *Hofstee* (ευθεία) (Κλώνης, 2007).

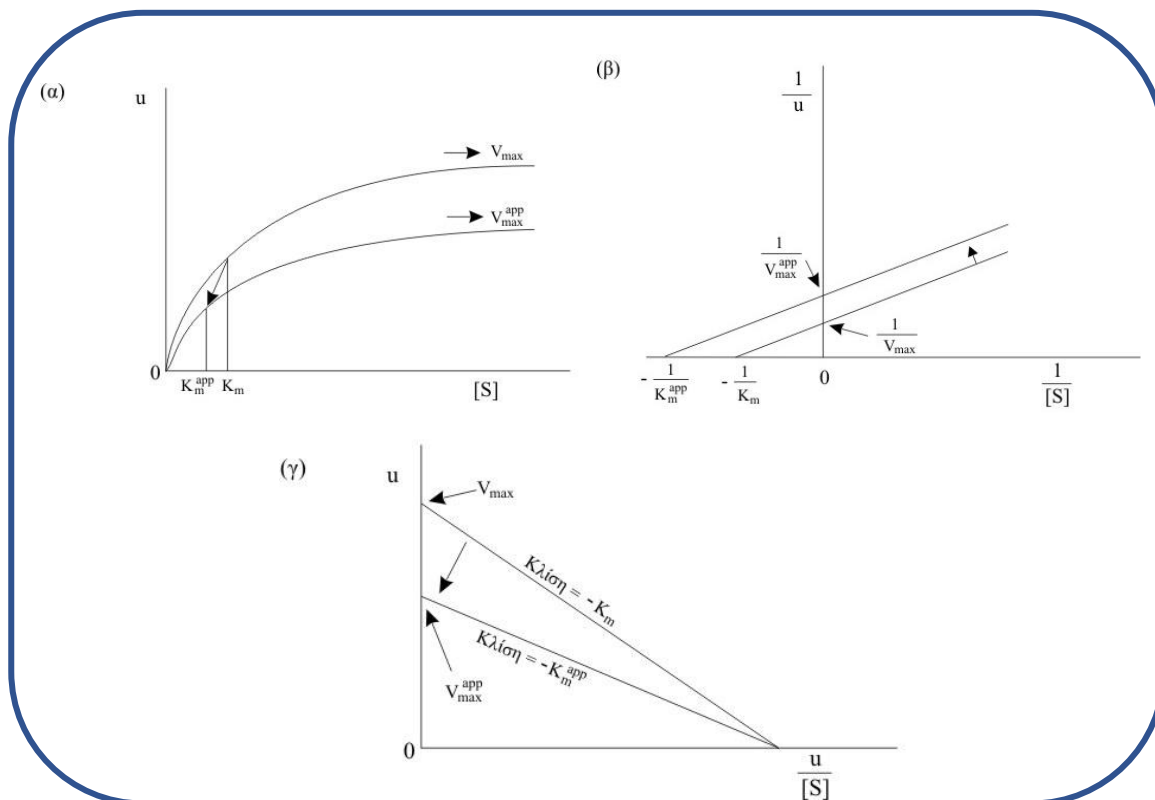
Στην περίπτωση της *παραβολικής συναγωνιστικής αναστολής*, δεδομένου ότι το δευτερογενές γράφημα, που αντλεί τα δεδομένα του από τη γραφική απεικόνιση *Lineweaver-Burk*, δεν εμφανίζει γραμμικότητα (παρά μόνο για ορισμένες συγκεντρώσεις αναστολέα), αλλά παίρνει τη μορφή παραβολής, η σταθερά αναστολής K_i υπολογίζεται κατόπιν επεξεργασίας των δεδομένων του δευτερογενούς γραφήματος και το σχηματισμό μιας νέας γραφικής παράστασης, των Δ Slopes συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα. Από τη γραφική απεικόνιση των δίπλων αντιστρόφων της τελευταίας προκύπτει ο υπολογισμός της τιμής της K_i , δεδομένου ότι το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα ισούται με $-1/K_i$. Η φυσική έννοια αυτού του φαινομένου είναι ότι υπάρχει δέσμευση και δεύτερου μορίου αναστολέα στο ένζυμο, σε θέση διαφορετική από εκείνη που δεσμεύεται το υπόστρωμα και η οποία είναι δεσμευμένη από το πρώτο μόριο αναστολέα, ώστε συνολικά παρατηρείται αύξηση της αναστολής (Knecht and Löffler, 2000; Cornish-Bowden, 2012). Εάν η καμπύλη του δευτερογενούς διαγράμματος είναι υπερβολή, τότε και έχουμε *υπερβολική συναγωνιστική αναστολή*, τότε ο υπολογισμός της K_i γίνεται με τον ίδιο τρόπο, η δε φυσική έννοια είναι ότι, παρουσία αναστολέα και υποστρώματος, πραγματοποιείται καταλυτική αντίδραση με μικρότερη ταχύτητα συγκριτικά με την απουσία αναστολέα (Nuhoglu and Yalcin, 2005).

1.12.2 Ανταγωνιστική αναστολή

Η ανταγωνιστική αναστολή αποτελεί το αντίθετο της συναγωνιστικής. Ο αναστολέας και το υπόστρωμα δεσμεύονται σε διαφορετική θέση στο ένζυμο, ωστόσο προκειμένου να δεσμευτεί ο αναστολέας, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έχει δεσμευτεί προηγουμένως το υπόστρωμα στο ένζυμο (Kim and Uyama, 2005). Το πρότυπο ισορροπίας της ανταγωνιστικής αναστολής είναι το ακόλουθο:



Όπου E είναι το ένζυμο, I ο αναστολέας, S το υπόστρωμα και K_I η σταθερά της ανταγωνιστικής αναστολής και ισούται με $[ES][I] / [ESI]$ (Εικόνα 1.11) (Cornish-Bowden, 2012).



Εικόνα 1.11: Ανταγωνιστική αναστολή. Γραφική παράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (u) συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος $[S]$ απουσία και παρουσία ανταγωνιστικού

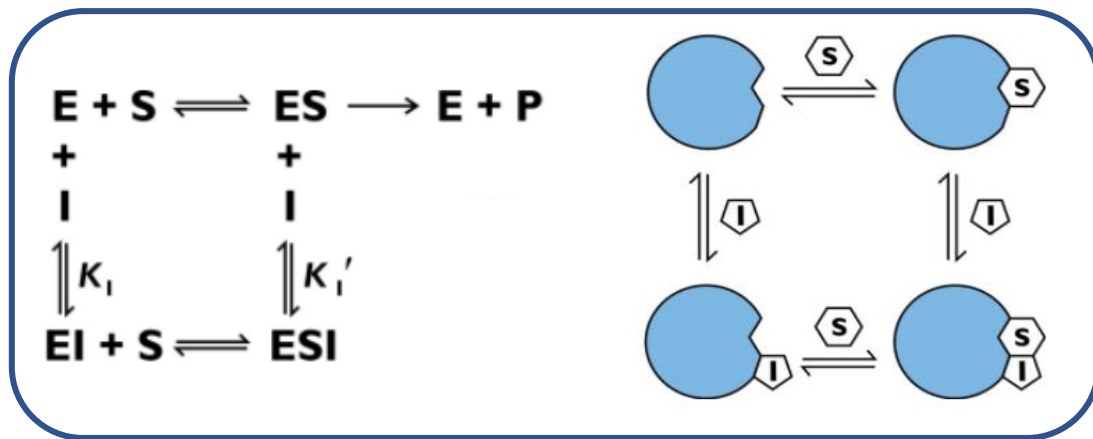
αναστολέα. (α) Κλασική *Michaelis Menten* (ορθογώνια υπερβολή), (β) διπλών αντιστρόφων (ευθεία) και (γ) *Hofstee* (ευθεία) (Κλώνης, 2007).

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

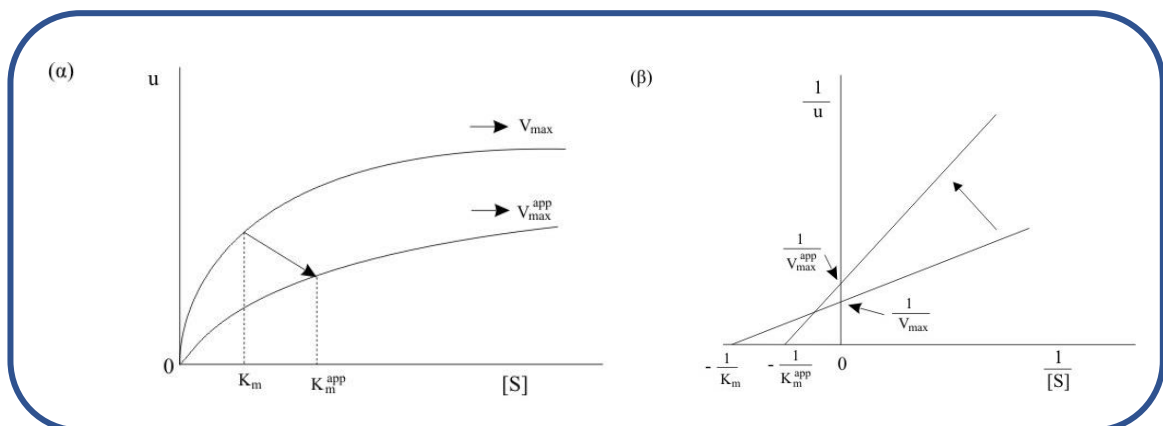
1.12.3 Μικτή αναστολή

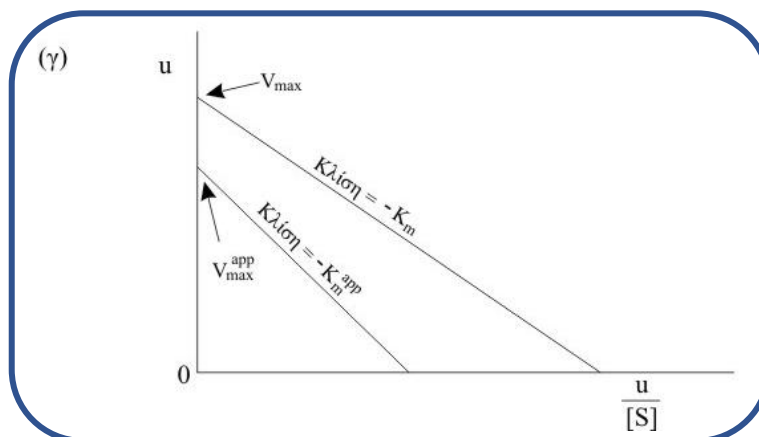
Η μικτή αναστολή αποτελεί συνδυασμό συναγωνιστικής και ανταγωνιστικής αναστολής. Συνεπώς, ο αναστολέας που επιδεικνύει μικτή αναστολή δεσμεύεται στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο (Kim and Uyama, 2005; Cornish-Bowden, 2012).

Το πρότυπο ισορροπίας της μικτής αναστολής είναι το ακόλουθο:



Όπου E είναι το ένζυμο, I ο αναστολέας, S το υπόστρωμα και K_i και K_i' οι σταθερές της μικτής αναστολής, όπου $K_i \neq K_i'$ (Εικόνα 1.12).





Εικόνα 1.12: Μικτή αναστολή. Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής της αντίδρασης (u) συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος [S] απουσία και παρουσία μικτού αναστολέα $K_{ic} < K_{iu}$. (α) Κλασική *Michaelis Menten* (ορθογώνια υπερβολή), (β) διπλών αντιστρόφων (ευθεία) και (γ) *Hofstee* (ευθεία) (Κλώνης, 2007).

1.12.4 Μη συναγωνιστική αναστολή

Η φερόμενη ως μη συναγωνιστική αναστολή αποτελεί απλώς μία υποπερίπτωση της μικτής αναστολής όπου $K_I = K_I'$.

1.13 Στόχος διατριβής

Η παρούσα διατριβή χωρίζεται σε τρεις ενότητες. Στην πρώτη ενότητα μελετάται η καταλυτική και δομική πολυπλοκότητα των GST ισοενζύμων της *tau* τάξης. Εφαρμόστηκε *in vitro* κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη με εφαρμογή της μεθόδου DNA shuffling. Τα νέα ένζυμα που προέκυψαν μελετήθηκαν δομικά με εφαρμογή βιοφυσικών μεθόδων καθώς και με ενζυμική κινητική. Επιπλέον, επιλύθηκε κρυσταλλογραφικά η τρισδιάστατη δομή του ισοενζύμου sh4 που εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα και δημιουργήθηκε με ανασυνδυασμό διαφορετικών γονιδίων. Τέλος μελετήθηκαν οι παράγοντες που συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα των ενζύμων. Τα ένζυμα, που προήλθαν από τη διαδικασία της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης, χαρακτηρίστηκαν ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητά τους να αποτελέσουν καταλυτικούς βιοαποικοδομητές τοξικών ενώσεων με στόχο την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Η δεύτερη ενότητα αφορά στη μελέτη φυτικών ισοενζύμων για να διαπιστωθεί ο ρόλος τους στην αποτοξίνωση τοξικών ενώσεων ή στη δέσμευση βιοδραστικών μεταβολιτών που παίρνουν μέρος στους μηχανισμούς ρύθμισης των κυττάρων και της άμυνας.

Τέλος, στην τρίτη ενότητα επιθυμητά γονίδια, της *alpha* και της *rho* κλάσης, από *Mus musculus*, μελετήθηκαν ως προς τα κινητικά τους χαρακτηριστικά και την εκλεκτικότητά τους. Επιπλέον, λύθηκε η κρυσταλλοδομή του ισοενζύμου *MmGSTP1-1* ισοενζύμου ώστε να μελετηθεί εκτενέστερα η σχέση δομής-λειτουργίας.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Βιολογικά Υλικά

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής και με σκοπό την κλωνοποίηση και την έκφραση των GST γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5-CT/TOPO® με τα δεκτικά κύτταρα DH5a για την επιλογή γονιδίου, καθώς και εκφραστικά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) τα οποία προήλθαν από την εταιρεία Novagen. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pETite c-His Kan vector με τα δεκτικά κύτταρα HI-Control™ 10G για την επιλογή γονιδίου, της εταιρείας Lucigen (Η.Π.Α.), καθώς και εκφραστικά κύτταρα HI-Control BL21 (DE3) chemically competent cells (SOLOs) τα οποία προήλθαν από την εταιρεία Lucigen (Η.Π.Α.). Στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται οι γενότυποι των στελεχών που αναφέρονται παραπάνω.

Πίνακας 2.1: Οι γενότυποι των στελεχών *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Στέλεχος <i>E.coli</i>	Γενότυπος
DH5a	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+), λ-
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
HI-Control 10G	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) nupG λ - tonA /Mini-F lacI ^{q1} (Gent ^R)
HI-Control BL21 (DE3) (SOLOs)	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm(DE3)/ Mini-F lacI ^{q1} (Gent ^R)

Το RNA που χρησιμοποιήθηκε στο Κεφάλαιο 4 αποτελεί μια ευγενική προσφορά της κυρίας Ελένης Ντούνη, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Εργαστηρίου Γενετικής.

2.1.2 Ένζυμα και πρωτεΐνες

Η Taq DNA πολυμεράση (5U/μL) προήλθε από την εταιρεία New England Biolabs (Αγγλία), η Pfu DNA πολυμεράση (1U/μL) προήλθε από την εταιρεία Finenzymes

(Φιλανδία), η KAPA High fidelity προήλθε από την εταιρία KAPA Biosystems (Η.Π.Α.). Η Accura® High-Fidelity (2U/μL) πολυμεράση προήλθε από την εταιρεία Lucigen (Η.Π.Α.). Η Q5® High-Fidelity (0,02U/μL) πολυμεράση προήλθε από την εταιρεία BioLabs-New England, Inc. Η νουκλεάση DNaseI (2U/μL) προήλθε από την εταιρεία Invitrogen (Η.Π.Α.).

2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια, kits και λοιπά

Χημικά Αντιδραστήρια: 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) (καθαρότητας 98 %), 1βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) (καθαρότητας 98 %), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) (καθαρότητα 97 %), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) (καθαρότητα > 99 %), trans-4-φαινυλ-3-βουτεν-2-όνη (καθαρότητας 99 %), βενζοϊκό υπεροξείδιο (καθαρότητας 75 %), trans-2-ενενάλη (καθαρότητας > 93%), γλουταθειόνη (GSH), ρυθμιστικό Trizma-base, δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS), 1-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ αιθέρας, σουλφανιλαμίδη (καθαρότητας 99 %), αλλυλ-ισοθειοκυανικός εστέρας (καθαρότητας 95 %), προπυλ-ισοθειοκυανικός εστέρας (καθαρότητας 95 %), αιθακρινικό οξύ, τετρα-βουτυλο-υπεροξείδιο (καθαρότητας 70 %), αλβουμίνη μόσχου (BSA) (fraction V), υπερθειϊκό αμμώνιο, αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη προήλθαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Τα αντιδραστήρια 2,2-διθειοαιθανόλη (καθαρότητας 90 %), 4-χλώρο-7νιτροβενζοφουραζάνιο (καθαρότητας 98 %) και το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου (CuOOH) ήταν της εταιρείας Fluka (Γερμανία). Η ουρία (καθαρότητας > 99,5 %) είναι της εταιρίας PanReac AppliChem.

Επίσης, τα χρωματογραφικά υλικά Sepharose CL6B και S-Hexyl-GSH, ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) προήλθε από την εταιρεία AppliChem και η αγαρόζη από την εταιρεία Invitrogen. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250) ήταν της εταιρείας Merck. Το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη και το άγαρ προήλθαν από την εταιρεία Scharlau (Ισπανία). Το χλωριούχο νάτριο και το δισόξινο φωσφορικό κάλιο ήταν από τον οίκο Merck.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα kit QIAquick™ Gel Extraction από την εταιρία Quiagen, MiniPlasmid isolation kit και PCR clean-up Gel extraction από την εταιρία

Macherey–Nagel. Το Protein Thermal Shift™ Dye Kit από την εταιρία ThermoFisher Scientific.

Ζιζανιοκτόνα: Τα alachlor, metolachlor, atrazine, diuron, fluorodifen ήταν από την εταιρεία Riedel de Haen (Γερμανία). Τα terbuthilazine, desmedipham, phenmedipham ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή κυρίου Βόντα Ιωάννη και του Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εντομοκτόνα: Τα fenvalerate, permethrin, malathion, carbaryl ήταν από την εταιρεία Riedel de Haen (Γερμανία). Τα methomyl, pirimicarb, lambda- cyhalothrin, spiromesifen, spirotetramat, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, diflubenzuron, triflumuron, boscalid, metalaxyl, fenhexamid, fluoxastrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin και trifloxystrobin ήταν προσφορά του Καθηγητή κυρίου Βόντα Ιωάννη και του Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μυκητοκτόνα: Τα iprodione, vinclozolin, epoxiconazole, prothioconazole, triadimenol, mandipropamid, pyrimethanil, zodium zoxide, fluopyram, carbedazim, fludioxonil, tolclofosmethyl ήταν προσφορά του Καθηγητή κυρίου Βόντα Ιωάννη και του Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τέλος, οι εκκινητές για την αντίδραση πολυμεράσης συντέθηκαν από τις εταιρείες Cemias S.A. (Λάρισα, Ελλάδα) και Eurofins Genomics (Αυστρία). Οι δείκτες μοριακών μαζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ηλεκτροφορήσεις του DNA ήταν οι εξής: 1 Kb DNA ladder και 100 bp DNA ladder της εταιρείας New England Biolabs (Αγγλία) και 1 Kb DNA ladder της εταιρείας Lab Suppliers. Ο δείκτης μοριακών μαζών Protein Prestained Marker για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών ήταν της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.).

Για τη διαπίδυση χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης, με όριο αποκλεισμού 12 kDa της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

2.1.4 Εξοπλισμός

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αгарόζης έγινε με τη συσκευή της Biorad MINI-SUB® CELL GT και η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης

παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου έγινε με τη συσκευή της Biorad Mini-Protean® Tetra System συνδεδεμένες, και οι δύο, σε τροφοδοτικό SP500xT (500-volt, 400 mA) της εταιρίας Hoefel (Η.Π.Α.). Ο θερμικός κυκλοποιητής (PCR) που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας PE Applied Biosystems, μοντέλο Gene Amp® 9700.

Η μέτρηση του pH των διαλυμάτων, πραγματοποιήθηκαν με συσκευή ORION, μοντέλο 410A. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους (Hitachi), μοντέλο U-2000 και μοντέλο U-2900, με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm. Για απλή απορρόφηση χρησιμοποιήθηκε σπεκτροφωτόμετρο μονής δέσμης ορατού-υπεριώδους (Perkin Elmer).

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

Η θερμική δοκιμασία μετατόπισης (Differential Scanning Fluorimetry) έγινε με τη συσκευή STEP ONE StepOne™ System της Applied Biosystems®. Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης έγινε με τη συσκευή DSC 8500 της εταιρίας Perkin Elmer. Για τη συλλογή φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το Fluorescence Spectrometer LS 45 της Perkin Elmer.

2.1.5 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα

2.1.5.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων

Υγρό Θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB)	Υγρό Θρεπτικό μέσο λακτόζης
1 % (w/v) τρυπτόνη (ή πεπτόνη)	1 % (w/v) τρυπτόνη (ή πεπτόνη)
1 % (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl)	0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης
0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης	0,5 % (w/v) γλυκερόλη
	0,05 % (w/v) γλυκόζη
	0,2 % (w/v) λακτόζη
Για την παρασκευή τρυβλίων με στερεό	0,7 (w/v) Na ₂ SO ₄
θρεπτικό υλικό προστίθεται 1,5 % (w/v)	0,25 % (w/v) NH ₄ Cl
άγαρ.	0,01 % (w/v) MgCl ₂
	0,01 % (w/v) CaCl ₂
	0,01 % (w/v) KCl

2.1.5.2 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων αναμιγνύονται:

- 150 μL 0,5 M Tris-Cl pH 8
- 60 μL 0,5 M EDTA pH 8
- 75μL 2 M γλυκόζης
- 3 mL αποστειρωμένο νερό

Διάλυμα NaOH/SDS

Για την παρασκευή διαλύματος NaOH/SDS αναμιγνύονται:

- 114 μL 10 M NaOH
- 568 μL 10 % (w/v) SDS
- 5 mL αποστειρωμένο νερό

Διάλυμα RNάσης A

Για να παραχθεί το διάλυμα RNάσης A, διαλύεται η RNάση A σε 10 mM Tris-Cl pH 7,4 και 15 mM NaCl σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL. Το διάλυμα επωάζεται σε

υδατόλουτρο στους 100 °C για 15 min και αφού πρώτα πέσει η θερμοκρασία του σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) αποθηκεύεται στους -20 °C.

Διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A

Για την παρασκευή διαλύματος CH₃COONH₄/RNάσης A αναμιγνύονται:

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

2.1.5.3 Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων

Διάλυμα TB

Για την παρασκευή του διαλύματος προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων TB αναμιγνύονται:

- 10 mM PIPES
 - 55 mM MnCl₂
 - 15 mM CaCl₂
 - 250 mM KCl
- pH 6,7
(Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό KOH)

Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φίλτρου.

Διάλυμα CaCl₂ 25 Mm και 7 5mM

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

2.1.5.4 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x (Running buffer)

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

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

Διάλυμα ακρυλαμίδιου

Για την παρασκευή του διαλύματος ακολουθείται ο τύπος:

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

Έτσι για την παρασκευή 40 % ακρυλαμίδης αναμιγνύονται 40 g ακρυλαμιδίου και 1,07 g N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου σε 100 mL αποστειρωμένου νερού. Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (Separating buffer-14 %)

- 3,428 μL dd H₂O
- 2,450 μL ακρυλαμίδα 40 %
- 875 μL 3 M Tris-Cl pH 8,8
- 170 μL υπερθειϊκό αμμώνιο
- 70 μL SDS 10 %
- 6,25 μL TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (Stacking buffer-6 %)

- 3,319 μL dd H₂O
- 750 μL ακρυλαμίδα 40 %
- 625 μL 0,5 M Tris-Cl pH 6,8
- 250 μL υπερθειϊκό αμμώνιο
- 50 μL SDS 10 %
- 6,25 μL TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

- 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8
- 2 % (w/v) SDS
- 10 % (v/v) γλυκερόλη
- 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη
- 0,5 % (w/v) χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα SDS

- 10 % (w/v) SDS

Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS)

- 1,5 % (w/v) υπερθειϊκό αμμώνιο σε αποστειρωμένο νερό

Διάλυμα χρώσης

- 45 % (v/v) μεθανόλη
- 7 % (v/v) οξικό οξύ
- 1 % (w/v) Goomassie Brilliant Blue

Διάλυμα αποχρωματισμού I (Destaining I)

- 40 % μεθανόλη (v/v)
- 7 % οξικό οξύ (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού II (Destaining II)

- 5 % μεθανόλη (v/v)
- 7 % οξικό οξύ (v/v)

2.1.5.5 Ηλεκτροφόρηση DNA και RNA

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X

- 2 M Tris base
 - 5,71 % v/v CH₃COOH
 - 10 % v/v 0,5 M EDTA
- } pH 8,2 - 8,4 στους 25 °C

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και αποθήκευση στους 4 °C.

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

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

Διάλυμα πηκτής ηλεκτροφόρησης

- 1 % αγαρόζη (DNA) ή 2 % αγαρόζη (RNA)
- 1 mL 50xTAE
- 4 μL βρωμιούχο αιθίδιο
- 48,5 mL αποστειρωμένο νερό

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων σε πηκτή ηλεκτροφόρησης DNA

Το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων αποτελείται από:

- 10 mL διαλύματος γλυκερόλης 50 % v/v
- 200 μL από διάλυμα EDTA 0,5 M, pH 8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης - (300 mL)

- 6 mL διαλύματος 50xTAE
- 294 mL δις απιονισμένο νερό

2.1.5.6 Παρασκευή διαλύματος ουρίας 10 M

Για την παρασκευή διαλύματος ουρίας 100 mL αναμιγνύονται:

- 60 gr κρυσταλλικής ουρίας
 - 52 mL δις απιονισμένο νερό
 - 0,750 mL διαλύματος KH_2PO_4 mM, pH 6,5
- } Απαιτείται θέρμανση

Τέλος, ρυθμίζουμε το pH (αν χρειάζεται) στο 6,5 χρησιμοποιώντας HCl 1 M.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων HI-Control 10G, DH5A, BL21 (DE3) και HI-Control BL21 (DE3) (SOLOs) του βακτηρίου *E.coli* (Competent Cells)

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τον Chung *et al.*, 1989.

Από τρυβλίο με θρεπτικό διάλυμα LB, που περιέχει το απαραίτητο αντιβιοτικό στην κατάλληλη συγκέντρωση, λαμβάνεται μονή αποικία του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους, η οποία και αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο για 14-16 h στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση, στις 250 rpm. Στη συνέχεια, αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο 200 mL, μολύνεται με 1 mL από την αρχική καλλιέργεια και επωάζεται στους 37 °C, μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) στα 550 nm να είναι περίπου 0,5. Κατόπιν τοποθετείται η καλλιέργεια στον πάγο για 10 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 4.500 rpm στους 4 °C ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, η πάστα των κυττάρων επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα 25 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris, pH 8 όγκου ίσου με το μισό της αρχικής καλλιέργειας και ψύχεται για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 4.500 rpm στους 4 °C και επαναιώρηση των κυττάρων, με παγωμένο διάλυμα 75 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris, pH 8 όγκου 1/15 της αρχικής καλλιέργειας. Κατόπιν το αιώρημα τοποθετείται στον πάγο και προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 15 % (v/v). Αναδεύονται ήπια και διατηρούνται στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια μοιράζονται, σε κλάσματα των 50-100 μL, σε παγωμένα αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου erpendorfs και φυλάσσονται στους -80 °C.

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Η μεθοδολογία που περιγράφεται αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου της μεθόδου που περιγράφεται από τους Birnboim and Doly, 1979.

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό LB, παρουσία αντιβιοτικού στους 37 °C για 16 h υπό συνεχή ανάδευση στις 180 rpm. Ακολούθως 1-2 mL από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται τελείως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος

λύσης κυττάρων. Στη συνέχεια προστίθενται 400 μL από το διάλυμα NaOH/SDS. Το δείγμα αναμιγνύεται προσεχτικά και επωάζεται σε πάγο για 5 min ακριβώς. Μετά το πέρας των 4 min προστίθεται η RNάση A (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) σε παγωμένο $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, προκειμένου να παρασκευαστεί διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{RNάσης A}$ το οποίο προστίθεται στο δείγμα, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπανόλη 700 μL και μετά από ανάδευση το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1 mL 70 % (v/v) παγωμένης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τελικά κατόπιν εξάτμισης της αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα (DNA) επαναδιαλύεται σε 30 μL αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού.

2.2.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Για το μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων πραγματοποιείται η παρακάτω διαδικασία (Sambrook *et al*, 1989):

- Σε περίπου 100 μL δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Αναμιγνύονται καλά με ήπιο τρόπο και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων με επώασή τους στους 42 °C για 90 s και έπειτα αφήνονται στον πάγο για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους.
- Στη συνέχεια προστίθενται 500 μL θρεπτικού μέσου LB και το πλασμιδιακό DNA, αναμιγνύονται καλά και επωάζονται στους 37 °C για 1-1,5 h.
- Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρωση στις 2.000 rpm για 2 min προκειμένου να συγκεντρωθούν τα κύτταρα σαν ίζημα σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.
- Αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και σε αυτό που απομένει επαναδιαλύονται με ήπιο τρόπο τα κύτταρα.
- Η ποσότητα αυτή του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, όπου υπάρχει και ως μέσο επιλογής κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά.

- Τα τρυβλία επωάζονται στη συνέχεια στους 37 °C για 12-16 h. Εάν πρόκειται για υγρή προκαλλιέργεια ακολουθεί εμβολισμός απευθείας στη φλάσκα με το απαραίτητο αντιβιοτικό.

2.2.4 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37 °C για 12-16 h υπό συνεχή ανάδευση στις 180 rpm. 500 μ L από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf. Προστίθενται 500 μ L γλυκερόλης 50 % (v/v) και ακολουθεί καλή ανάμιξη. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

2.2.5 Ανάλυση DNA και RNA σε πηκτή αγαρόζης

Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, είναι απαραίτητο ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης μέσα στο οποίο θα κινηθούν τα τμήματα DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αναλόγως του μεγέθους των τμημάτων DNA και RNA που διαχωρίζονται, η συγκέντρωση του πηκτώματος της αγαρόζης μπορεί να κυμαίνεται από 1 % έως και 2 % w/v και έτσι καθορίζεται και το διαφορετικό μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται. Για την παρασκευή πηκτής ηλεκτροφόρησης η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Το διάλυμα προστίθεται σε κωνική φιάλη και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για χρονικό διάστημα 45 s (x2), ώστε να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 min ώστε να ελαττωθεί η θερμοκρασία της. Έπειτα προστίθεται ανάλογη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Στη συσκευή πήξης, η οποία είναι προετοιμασμένη κατάλληλα όπου είναι τοποθετημένη η απαραίτητη χτένα με τις ειδικές εσοχές (πηγαδάκια), όπου εγχέονται τα δείγματα, διοχετεύεται το διάλυμα της αγαρόζης και με ελαφρές ανακινήσεις διαχέεται η ποσότητα του EtBr στο σύνολο του πηκτώματος. Η πηκτή αφήνεται σε ηρεμία για διάστημα 15–20 min, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Όσο αναφορά στην προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση προσθέτουμε σε φιαλίδια τύπου erpendorf 5-15 μ L του προϊόντος DNA που μελετάμε και 5 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Για τον μάρτυρα, ο οποίος αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, προσθέτουμε 1 μ L καθώς και 5 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Το δείγμα και ο μάρτυρας αναδεύονται έντονα και στη συνέχεια

υποβάλλονται σε μια σύντομη φυγοκέντρηση για τυχόν απαλλαγή από αφρισμό που μπορεί να έχει προκληθεί.

Εφόσον το διάλυμα της πηκτής έχει σταθεροποιηθεί, μεταφέρεται στην ειδική συσκευή, όπου και πληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια φορτώνονται ο μάρτυρας και τα δείγματα. Σε ένα από τα πηγαδάκια προστίθεται χρωστική, για την καλύτερη παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου από 75 - 95 V περίπου για το DNA και από 100 - 110 V για το RNA, 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 ανίχνευση των ζωνών που εμφανίζονται.

2.2.6 Κατεργασία δειγμάτων με νουκλεάση DNase I

Τα δείγματα RNA υποβάλλονται σε κατεργασία με DNase I, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη χρωμοσωμικού DNA. Προκειμένου, λοιπόν, να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA χρησιμοποιείται RNase-free DNase, σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

- Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου erpendorf προστίθενται τα εξής:
 - 4-5 μg ολικού RNA (μέχρι 30 μL)
 - RQ1 DNase I (1U/ μg RNA)
 - 5 μL από το διάλυμα RQ1 DNase 10 \times
 - 1 μL RNase Out-DNase free
 - δις απιονισμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 50 μL
- Επώαση για 90 min στους 37 °C.
- Προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 150 μL .
- Προσθήκη 1:1 PIC.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf.
- Προσθήκη 1:1 CHCl_3 .
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf.
- Προσθήκη 1:10 3 M CH_3COONa pH 5,2.
- Προσθήκη 2,5 φορές τον αρχικό όγκο σε αιθανόλη.

- Το διάλυμα αντίδρασης αφήνεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 h.
- Την επόμενη μέρα μεταφέρονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 s.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 300 μL 70 % αιθανόλη.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Τα φιαλίδια τύπου errendorf μένουν στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για ~ 30 min να στεγνώσουν.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 20 - 25 μL δις απιονισμένου αποστειρωμένου νερού.

2.2.7 Σύνθεση cDNA

Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου errendorf προστίθενται κάθε φορά:

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

Ακολουθεί θέρμανση στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 min και τοποθέτηση των δειγμάτων απ' ευθείας στον πάγο. Μετά από γρήγορη φυγοκέντρηση προστίθενται τα εξής:

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

Αναδεύονται απαλά και επώάζονται στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 min. Προστίθεται 1 μL Superscript II RT και αναδεύονται απαλά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 50 min και μετά στους $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min, ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι ακριβείς συγκεντρώσεις των συστατικών, οι θερμοκύκλοι που απαιτούνται και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η κάθε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του πειράματος και περιγράφονται αναλυτικά στις μεθόδους κάθε κεφαλαίου. Τα συστατικά (ρυθμιστικό

διάλυμα πολυμεράσης, ευθύς και αντίστροφος εκκινητής, dNTPs, δείγμα, δις αποιονισμένο αποστειρωμένο νερό και πολυμεράση) προστίθενται σε φιαλίδιο τύπου erppendorf χωρητικότητας 0,2 mL. Στη συνέχεια αναμιγνύονται καλά και φυγοκεντρώνται για 1 min. Στο τέλος, προστίθεται η πολυμεράση και τα φιαλίδια τύπου erppendorf τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή. Όλα τα αναλώσιμα που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αποστειρωμένα.

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

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 94-95 °C για 3 min
<i>Κύκλος (30-40 κύκλοι)</i>	Αποδιάταξη στους 94-95 °C για 45 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 55-62 °C για 30 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 30 s
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (§ 2.2.5) και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (§ 2.2.24 και § 2.2.25).

2.2.9 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA και μετάφραση

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

2.2.10 Ετερόλογος έκφραση σε στελέχη κυττάρων *E.Coli* σε υγρό θρεπτικό μέσο LB

Σε κατάλληλη κωνική φιάλη που περιέχει 450 mL θρεπτικό μέσο, εμβολιάζονται 50 mL καλλιέργειας (16 ωρών) κατάλληλα μετασχηματισμένων κυττάρων. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C σε περιστροφικό αναδευτήρα (180 rpm), μέχρι η απορρόφηση του δείγματος στα 600 nm να φτάσει 0,6 όπου και προστίθεται ο επαγωγέας ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 4 h και φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm για 20 min στους 4 °C. Τέλος, τα κύτταρα συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20 °C, μέχρι να

ξανααχρησιμοποιηθούν.

2.2.11 Λύσιμο κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος

Επιθυμητή ποσότητα κυτταρικής μάζας αιωρείται στο τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM KH_2PO_4 , pH 7. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την επίδραση υπερήχων. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται 5-6 φορές και έχει διάρκεια 10-15 s η καθεμία, με ένα μεσοδιάστημα 10 s. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας το δείγμα βρίσκεται σε πάγο προς αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών λόγω της παραγόμενης θερμότητας από τους υπέρηχους. Το τελικό αιώρημα το οποίο έχει πλέον αυξημένο ιξώδες, φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 s. Τέλος, συλλέγουμε το υπερκείμενο και το χρησιμοποιούμε κατάλληλα.

2.2.12 Διαπίδυση

Η διαπίδυση αποτελεί μια διαδικασία διαχωρισμού των μορίων ενός διαλύματος βάσει του βαθμού διάχυσής τους μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, η οποία αποτελείται συνήθως από κυτταρίνη, διαθέτει μικρού μεγέθους πόρους και επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν. Τα μικρότερα μόρια τείνουν να κινούνται προς τα μέσα ή έξω της μεμβράνης, στην κατεύθυνση της μειούμενης συγκέντρωσης.

Το κυτταρικό αιώρημα, εισάγεται στην ειδική μεμβράνη και τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει ένα διαφορετικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα). Η διαδικασία αυτή διαρκεί 18-24 h και λαμβάνει χώρα στους 4 °C με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα και αργών περιστροφικών κινήσεων της μεμβράνης.

2.2.13 Καθαρισμός GST ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή συγγένειας BES-GSH

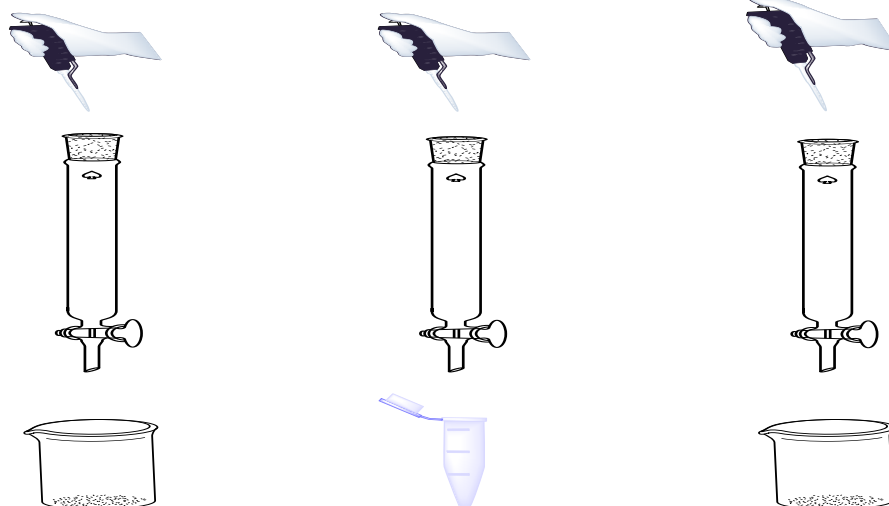
Η διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας είναι η ακόλουθη (Εικόνα 2.1):

Αρχικά, ο προσροφητής συγγένειας 1,4 βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) εγκιβωτίζεται σε χρωματογραφική στήλη (1-2 mL) και εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (20 mM KH_2PO_4 pH 7, 10 mL) στους 4 °C. Έπειτα, η στήλη φορτώνεται με το βιολογικό υλικό. Λόγω της συγγένειας του δεσμευτή και του ενζύμου-στόχου, το αντίστοιχο σύμπλοκο

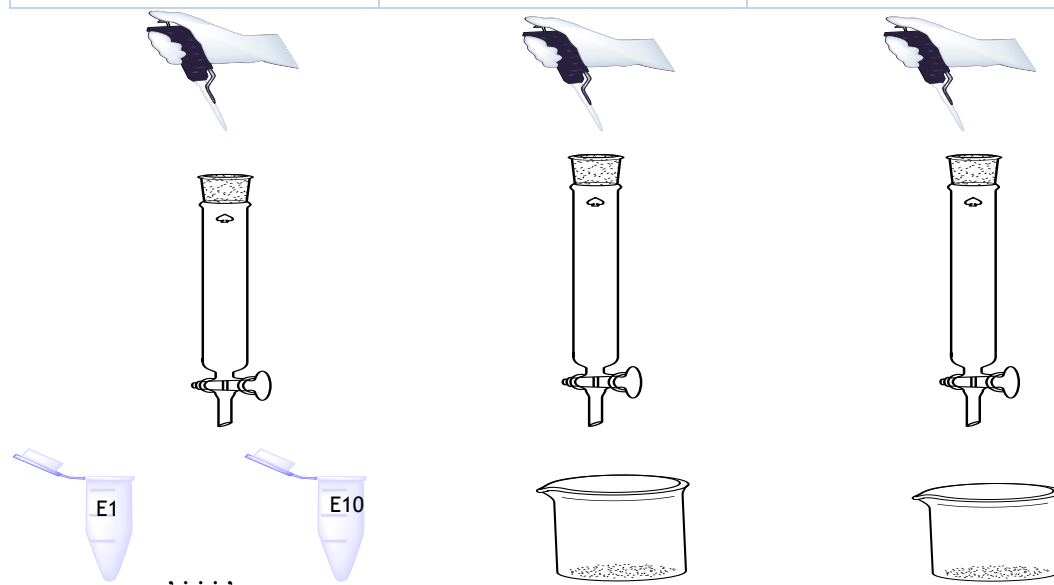
σχηματίζεται στη στήλη. Ακολούθως, η στήλη πλένεται με το διάλυμα εξισορρόπησης (10 mL), ώστε να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια. Επιπρόσθετα, το προσροφημένο ένζυμο, εκλύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης, το οποίο αποτελείται από 10 mM GSH διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης pH 7 και συναγωνίζεται το σύμπλοκο ένζυμο-δεσμευτή. Η έκλυση του βιολογικού υλικού γίνεται σε διαφορετικές κλασματώσεις (1-2 mL). Τέλος, το χρωματογραφικό υλικό αναγεννάται με τα διαλύματα 0,1 M Tris-Cl και 1 M NaCl pH 8,5 σε πρώτο στάδιο (10 mL), με 0,1 M CH₃COONa και 1 M NaCl pH 5,5 (10 mL) σε δεύτερο στάδιο και, τέλος, με 10 mL δις απιονισμένο νερό.

Εικόνα 2.1: Στάδια της χρωματογραφίας συγγένειας

<i>1^ο Στάδιο</i>	<i>2^ο Στάδιο</i>	<i>3^ο Στάδιο</i>
Πλύσιμο στήλης με 10 mL ddH ₂ O και εξισορρόπηση με 10 mL 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7	Έγχυση βιολογικού υλικού	Απομάκρυνση αδέσμευτων ουσιών με 10 mL 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7



<i>4^ο Στάδιο</i>	<i>5^ο Στάδιο</i>	<i>6^ο Στάδιο</i>
Έκλουση του ενζύμου με υδατικό διάλυμα 10 mM GSH, 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7	Αναγέννηση χρωματογραφικού υλικού με 10 mL 0,1 M Tris-Cl και 1 M NaCl pH 8,5	Αναγέννηση χρωματογραφικού υλικού με 10 mL 0,1 M CH ₃ COONa και 1 M NaCl pH 5,5



2.2.14 Συνολικός προσδιορισμός πρωτεΐνης (Μέθοδος 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 (Krunger, 1994). Για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφεται από την Bradford, 1976:

Αρχικά, παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα της χρωστικής (stock Bradford) διαλύοντας 100 mg σε 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50 % v/v) και στη συνέχεια, προστίθενται 100 mL διαλύματος πυκνού φωσφορικού οξέος (85 % v/v). Το μίγμα μεταφέρεται σε σκοτεινό δοχείο και ακολουθεί απαέρωση για 20 min σε υπέρηχους. Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινό δοχείο, για προστασία από το φως και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, αραιώνεται ποσότητα του πυκνού διαλύματος σε αναλογία 1/4 (ένα μέρος διαλύματος προς τέσσερα μέρη νερού) και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 24 h. Το άγνωστο δείγμα πρωτεϊνών προσδιορίζεται με την ανάμειξη 950 μL του αραιωμένου διαλύματος της χρωστικής και από 1-50 μL δείγματος κατάλληλης συγκέντρωσης, ώστε στην κυψελίδα να περιέχονται 2-10 μg πρωτεΐνης. Σε περίπτωση μεγάλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης το δείγμα αραιώνεται και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τελικό όγκο 1 mL. Για να γίνει ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε το συντελεστή μοριακής απορρόφησης «ε», ο οποίος και υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Πίνακας 2.2). Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται έχοντας σαν πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 2.2: Όγκοι και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Bradford για την καμπύλη αναφοράς και για το άγνωστο δείγμα.

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

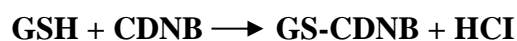
Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για 20 min και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, αφού πρώτα έχουμε μηδενίσει με το μάρτυρα. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης σύμφωνα με το νόμο του Beer-Lambert και τον τύπο:

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

όπου A: απορρόφηση
 c: συγκέντρωση (mg/mL)
 ε: συντελεστής μοριακής απόσβεσης (υπολογίζεται από τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς και είναι η κλίση της ευθείας)
 d: μήκος κυψελίδας 1 cm

2.2.15 Φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs

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 (Labrou *et al.*, 2001).



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

- Ρυθμιστικό διάλυμα: KH₂PO₄, 0,1 M, pH 6,5

- GSH: 75 mM σε δις απιονισμένο νερό
- CDNB: 30 mM σε αιθανόλη
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος).

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, προστίθεται το CDNB, τη GSH, ανακινούμε και τέλος κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος. Αναλυτικότερα, οι όγκοι για μια τυπική φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας έχουν ως εξής:

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	934	934 - x (*)
CDNB	33	33
GSH	33	33
Ένζυμο	-	x (*)
Συνολικός όγκος	1000	1000

(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

2.2.16 Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs

Μονάδα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται η ‘ενζυμική μονάδα’ (U) που ισούται με την ποσότητα ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ή παράγει 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό, στους 25 °C σε pH 6,5. Συγκεκριμένα, κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης καταγράφεται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης (ΔA) σε στοιχειώδη χρόνο (Δt). Αρχικά, λαμβάνεται ευθεία η οποία κατά την εξέλιξη της αντίδρασης καμπυλώνει. Η κλίση της εφαπτομένης σε κάθε σημείο της καμπύλης ορίζεται ως η ταχύτητα της αντίδρασης.

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

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

όπου :

- $\Delta A/\Delta t$: καθαρή μεταβολή απορρόφησης στα 340 nm (1/min)
 $V_{\text{συνολ}}$: συνολικός όγκος αντίδρασης (mL)
 $V_{\text{δειγ}}$: όγκος του δείγματος ενζύμου στην αντίδραση (mL)
 d : μήκος οπτικής διαδρομής φωτός μέσα από το δείγμα (1 cm)
 ϵ : συντελεστής απόσβεσης (για το CDNB = 9.600 L/mol/cm ή 1/M/cm)

2.2.17 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (SA)

Η ειδική δραστηριότητα μας δείχνει πόσα mg πρωτεΐνης έχουμε σε κάθε mL ενζυμικού παρασκευάσματος. Δίνεται από τον παρακάτω τύπο, στον οποίο τα μεγέθη αναφέρονται στον ίδιο όγκο παρασκευάσματος:

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

2.2.18 Υπολογισμός Απόδοσης Καθαρισμού

Δίνονται από τον παρακάτω τύπο (x100) :

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

2.2.19 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τριχλωροακετικό Οξύ (TCA)

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

- Προσθήκη υποτετραπλάσιου όγκου TCA (100 % v/v) από τον όγκο κάθε έκλουσης και παραμονή τους στον πάγο για 20 min.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 9 min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μ L παγωμένης ακετόνης.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 8 min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 150 μ L παγωμένης ακετόνης.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 8 min.

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

2.2.20 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο και τον προσδιορισμό μοριακού βάρους. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli, 1970:

Τοποθετούμε τα τζαμάκια στην συσκευή προετοιμασίας της πηκτής, με το τζαμάκι με την εσοχή στην εξωτερική πλευρά. Στη συνέχεια ετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (§ 2.1.2.4). Αφού αναδεύσουμε το διάλυμα, το ρίχνουμε μέσα στην εσοχή των τζαμιών. Στη συνέχεια, προσθέτουμε στην επιφάνεια της πηκτής 1 mL απιονισμένου νερού ώστε να αποτρέψουμε τη δημιουργία φυσαλίδων. Αναμένουμε 30 min ώστε να πολυμεριστεί το διάλυμα και να σχηματιστεί η πηκτή διαχωρισμού. Αφού περάσει ο απαιτούμενος χρόνος και έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, απομακρύνουμε το νερό. Στη συνέχεια εισάγουμε το διάλυμα για την πηκτή επιστοίβαξης (§ 2.1.2.4). Αφού αναμιζουμε το διάλυμα, το ρίχνουμε μέσα στην εσοχή και στη συνέχεια προσθέτουμε το χτενάκι. Περιμένουμε για 20-25 min ώστε να σχηματιστεί η πηκτή. Έπειτα, αφαιρούμε τα χτενάκια προσεχτικά και τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το τζαμάκι με την εσοχή να είναι στην εσωτερική πλευρά. Προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (§ 2.1.2.4) τελικού όγκου 700 mL και κατόπιν φορτώνονται τα δείγματα και ο μάρτυρας. Συνδέουμε το τροφοδοτικό για περίπου 30-45 min σε ένταση 20 mA.

2.2.21 Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

Για να προχωρήσουμε στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης θα πρέπει να έχουμε προσδιορίσει την ολική ποσότητα της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford). Χρειαζόμαστε 20-50 μg πρωτεΐνης, έτσι αφού προσθέτουμε την ανάλογη ποσότητα σε μL από την πρωτεΐνη μας συμπληρώνουμε μέχρι τον όγκο των 20 μL με νερό και διάλυμα φόρτωσης (§ 2.1.2.4). Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στην κατάψυξη και αραιώνεται με μερκαπτοαιθανόλη για την αναγωγή των δισουλφυδικών δεσμών. Στη συνέχεια, παίρνουμε τα δείγματα μας και τα τοποθετούμε

σε υδατόλουτρο στους 95 °C για 5 min. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση 1 min στις 8.000 rpm. Τέλος, φορτώνουμε τα δείγματα μας και τοποθετούμε το καπάκι της συσκευής.

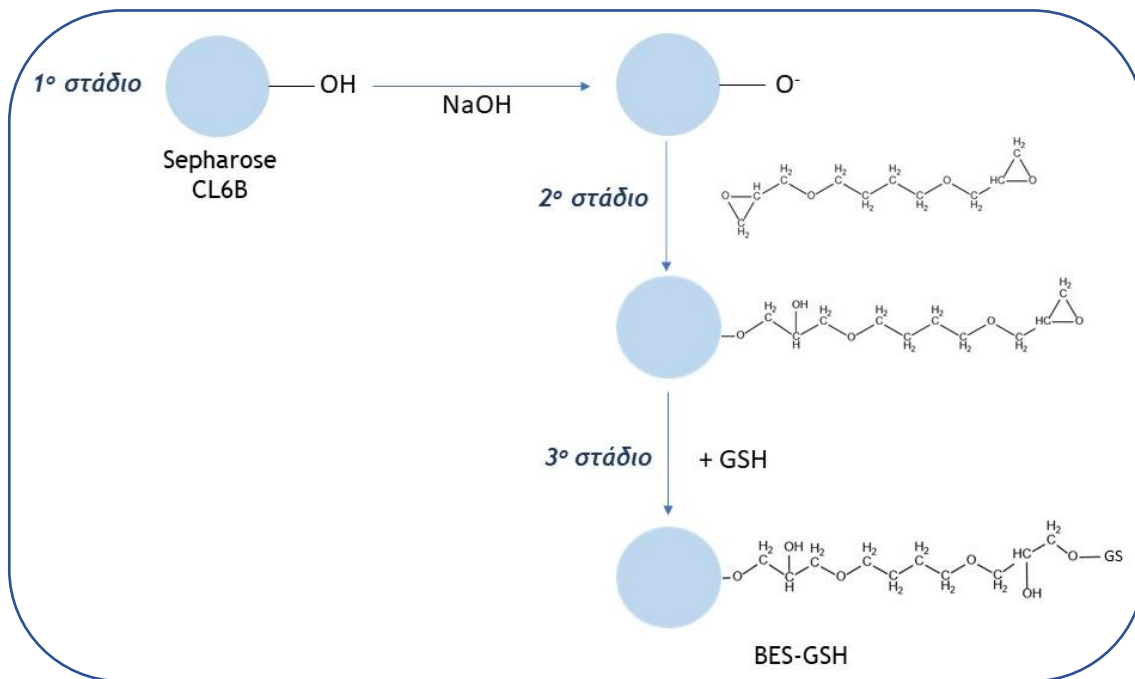
2.2.22 Χρώση με Goomassie Brilliant Blue R-250

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπίζεται σε υδατικό διάλυμα χρώσης για περίπου 20-30 min. Στη συνέχεια, η πηκτή αποχρωματίζεται για 1 h στο υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού I (Distaining I) ενώ αφήνεται για 16-24 h στο διάλυμα αποχρωματισμού II (Distaining II) όπου και διατηρείται (§ 2.1.2.5).

2.2.23 Σύνθεση προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρας- GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH)

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

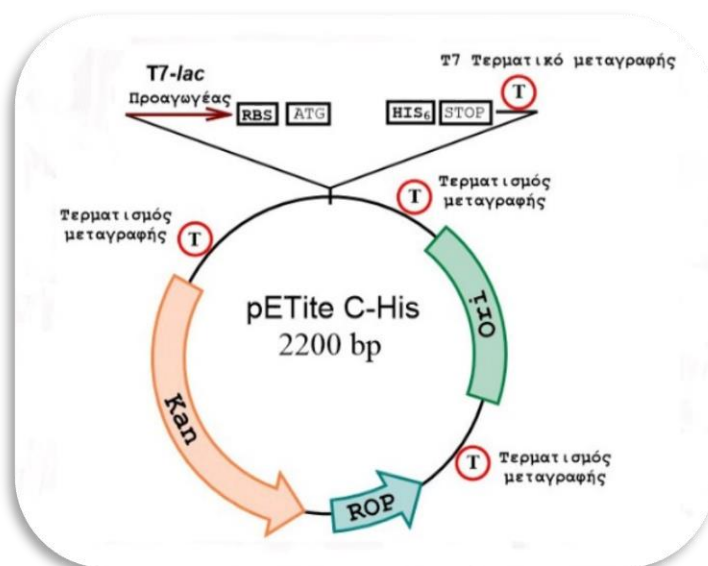
Στην ενεργοποιημένη πλέον αγαρόζη, προστίθενται 3 mL 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 h υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Το διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινο μπουκάλι, για να αποφευχθεί η υδρόλυση του αιθέρα. Έπειτα, το αιώρημα διηθείται και πλένεται με δις απιονισμένο νερό. Ακολουθεί προσθήκη της αγαρόζης σε διάλυμα GSH, το οποίο είναι διαλυμένο σε 1 M ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄ pH 8 (40 mL). Η αντίδραση αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 42 h, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Ακολουθεί διήθηση και πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο δις-απιονισμένου νερού. Η αποθήκευση γίνεται στους 4 °C, σε υδατικό διάλυμα 20 % αιθανόλης (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Στάδια σύνθεσης του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιόλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH).

2.2.24 Υποκλωνοποίηση με χρήση της τεχνολογίας Expresso™

Το σύστημα υποκλωνοποίησης και έκφρασης Expresso™ T7 βασίζεται στον επαγόμενο προαγωγέα του βακτηριοφάγου T7 και προσδίδει καλύτερο έλεγχο στη γονιδιακή έκφραση. Ο πλασμιδιακός φορέας (Εικόνα 2.3) που χρησιμοποιείται είναι ο pETite™ και παρέχεται σε επεξεργασμένη μορφή και ευθυγραμμισμένος.



Εικόνα 2.3: Ο πλασμιδιακός φορέας ετερόλογης έκφρασης pETite™. ATG: αναρτητήριο κωδικόνιο μετάφρασης, HIS₆: επίτοπος έξι ιστιδινών στο C-τελικό άκρο, STOP: τερματισμός μετάφρασης, Kan: γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, Ori: αρχή της αντιγραφής του πλασμιδίου και ROP: καταστολέας υψηλής αντιγραφής για χαμηλό αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου.

Η υποκλωνοποίηση ενός γονιδίου πραγματοποιείται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, καθώς το γονίδιο που πρόκειται να εισαχθεί διαθέτει στα άκρα του τμήμα από το πλασμίδιο. Συνεπώς, το επιθυμητό γονίδιο που πρόκειται να εισαχθεί, πρέπει πρώτα να έχει ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχοντας και τα κατάλληλα τμήματα του πλασμιδίου στην αρχή και στο τέλος του, προς διευκόλυνση του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι εκκινητές που σχεδιάζουμε στην συγκεκριμένη περίπτωση έχουν την εξής μορφή:

Ευθύς

5'-GAA GGA GAT ATA CAT ATG XXX₂ XXX₃ XXX₄ XXX₅ XXX₆ XXX₇ XXX₈-3'

Όπου, XXX₂-XXX₈ αντιπροσωπεύουν τα αρχικά κωδικόνια του γονιδίου όπου μελετάμε.

Ανάστροφος

5'-GTG ATG GTG GTG ATG ATG TTA XXX_v XXX_{v-} -XXX_{v-2} XXX_{v-3} XXX_{v-4} XXX_{v-5} XXX_{v-6}- 3'

TTA: κωδικόνιο λήξης που παρεμβάλλεται μεταξύ του κλωνοποιημένου γονιδίου και του επιτόπου.

Η PCR πραγματοποιείται με χρήση πολυμεράσης υψηλής πιστότητας (High Fidelity) για την ελαχιστοποίηση των λαθών κατά την αντιγραφή. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
2x διάλυμα αντίδρασης	25
dNTPs (2,5 mM)	0,5
Ευθύς εκκινητής (10 pmol/μL)	1
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/μL)	1
Accura High-Fidelity πολυμεράση	1
Δείγμα	1-5
Δις απιονισμένο νερό	21,5 - δείγμα
Τελικός όγκος	50

Οι θερμοκύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του υπό κλωνοποίηση γονιδίου είναι οι ακόλουθοι:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 94 °C για 30 s
<i>Κύκλος (25 κύκλοι)</i>	Αποδιάταξη στους 94 °C για 15 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 42-65 °C για 15 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Μετά την επιβεβαίωση της παραλαβής του προϊόντος PCR μέσω ηλεκτροφόρηματος σε πηκτή αгарόζης, ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία της υποκλωνοποίησης:

1. Σε αποστειρωμένο και παγωμένο δοχείο falcon των 15 mL προσθέτουμε:
 - 50 μ L από δεκτικά κύτταρα για υποκλωνοποίηση (HI-Control 10G)
 - 1-3 μ L από το προϊόν της PCR αναλόγως της έντασης του σήματος στο ηλεκτροφόρημα
 - 25 ng από τον φορέα pETite™
2. Γίνεται απλή ανακίνηση του μίγματος με τη βοήθεια ρύγχους από πιπέτα χωρίς την πραγματοποίηση αναρροφήσεων.
3. Ακολουθεί επώαση για 30 min στον πάγο.
4. Πραγματοποιείται θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 s και έπειτα τοποθέτηση του δοχείου falcon στον πάγο για 2 min.
5. Προσθήκη 950 μ L από το θρεπτικό μέσο ανάκαμψης των κυττάρων, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για χρονικό διάστημα 1 h σε περιστροφικό αναδευτήρα στις 180 rpm.
7. Μετά πέρασ της 1 h, ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 30 s, ώστε να παραλάβουμε το σύνολο των κυττάρων.
8. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται επανεναιώρηση των κυττάρων σε 80-100 μ L από το ίδιο θρεπτικό μέσο.
9. Στρώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο LB, έχοντας ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 30 μ g/mL.
10. Επωάζεται το τρυβλίο στους 37 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.

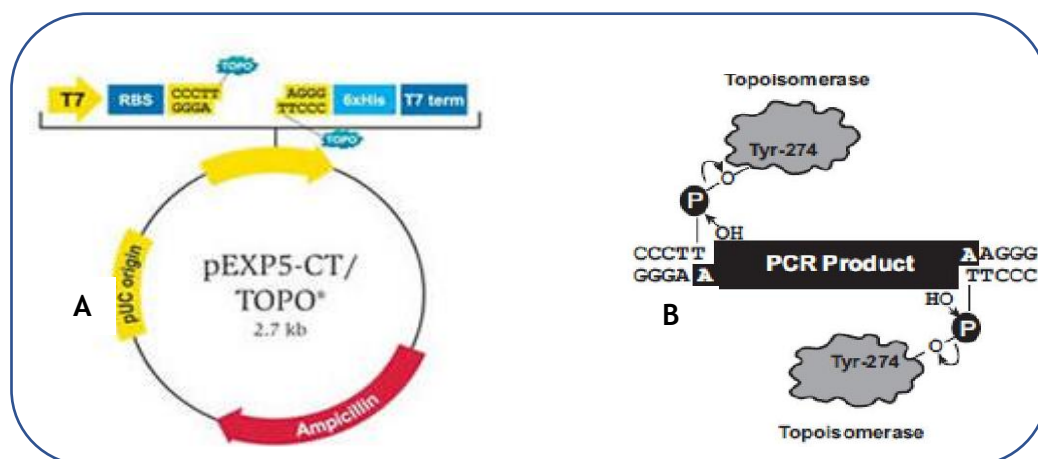
2.2.25 Υποκλωνοποίηση με χρήση της τεχνολογίας TOPO®

Τα στάδια που ακολουθούνται κατά την αντίδραση ένωσης των προϊόντων PCR στο φορέα pEXP5-CT/TOPO® (Εικόνα 2.4) είναι τα ακόλουθα:

1. Προσθήκη καταλοίπων αδεΐνης (A) στο 3' άκρο του προϊόντος PCR, προκειμένου να γίνει η πρόσδεσή του στον πλασμιδιακό φορέα. Για την προσθήκη αυτή αναμιγνύονται:

- 10 μL PCR προϊόντος
- 0,1 μL dATPs
- 5 μL ρυθμιστικό διάλυμα Ταq πολυμεράσης (10x)
- 1 unit Ταq πολυμεράση

Το μίγμα επωάζεται στους 72 °C για 10 min.



Εικόνα 2.4: (A) Ο πλασμιδιακός φορέας ετερόλογης έκφρασης Pexp5-CT TOPO. Ampicillin: γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, Origin: αρχή της αντιγραφής του πλασμιδίου. (B) Τρόπος πρόσδεσης του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα.

2. Ακολουθεί η αντίδραση κλωνοποίησης του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα (TOPO Cloning Reaction) όπου αναμιγνύονται:

- 4 μL προϊόντος
- 1 μL φορέα pEXP5-CT/TOPO®
- 1 μL διαλύματος αλάτων

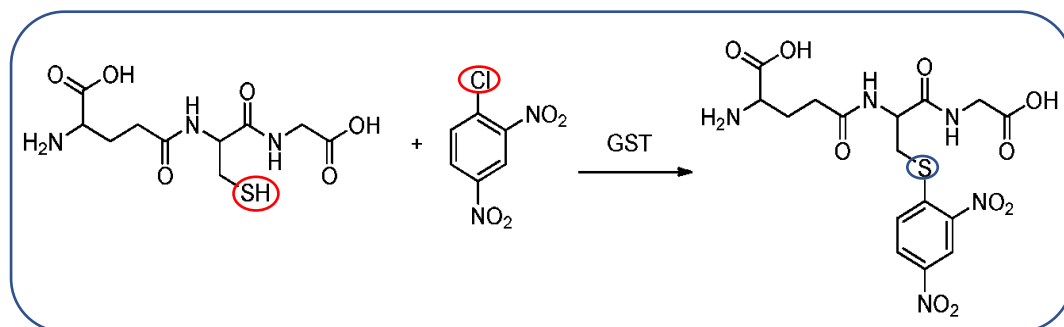
3. Το μίγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και έπειτα τοποθετείται τον πάγο.

4. Όλη η ποσότητα της αντίδρασης προστίθεται σε 50 μL δεκτικών κυττάρων και αναμιγνύονται με ήπιο τρόπο.

5. Ακολουθεί επώαση για 30 min στον πάγο.
6. Πραγματοποιείται θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 s και έπειτα τοποθέτηση του φιαλιδίου τύπου erpedorf στον πάγο για 2 min.
7. Προστίθενται 250 μ L θρεπτικού μέσου LB, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για χρονικό διάστημα 1 h σε περιστροφικό αναδευτήρα στις 180 rpm.
9. Μετά πέρας της 1 h, ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 30 s, ώστε να παραλάβουμε το σύνολο των κυττάρων.
10. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται επανεναιώρηση των κυττάρων σε 80-100 μ L θρεπτικού μέσου LB.
11. Στρώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο LB, έχοντας ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μ g/mL.
12. Επιάζεται το τρυβλίο στους 37 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.

2.2.26 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα παράγωγα νιτροβενζολίου (CDNB, BDCB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl)

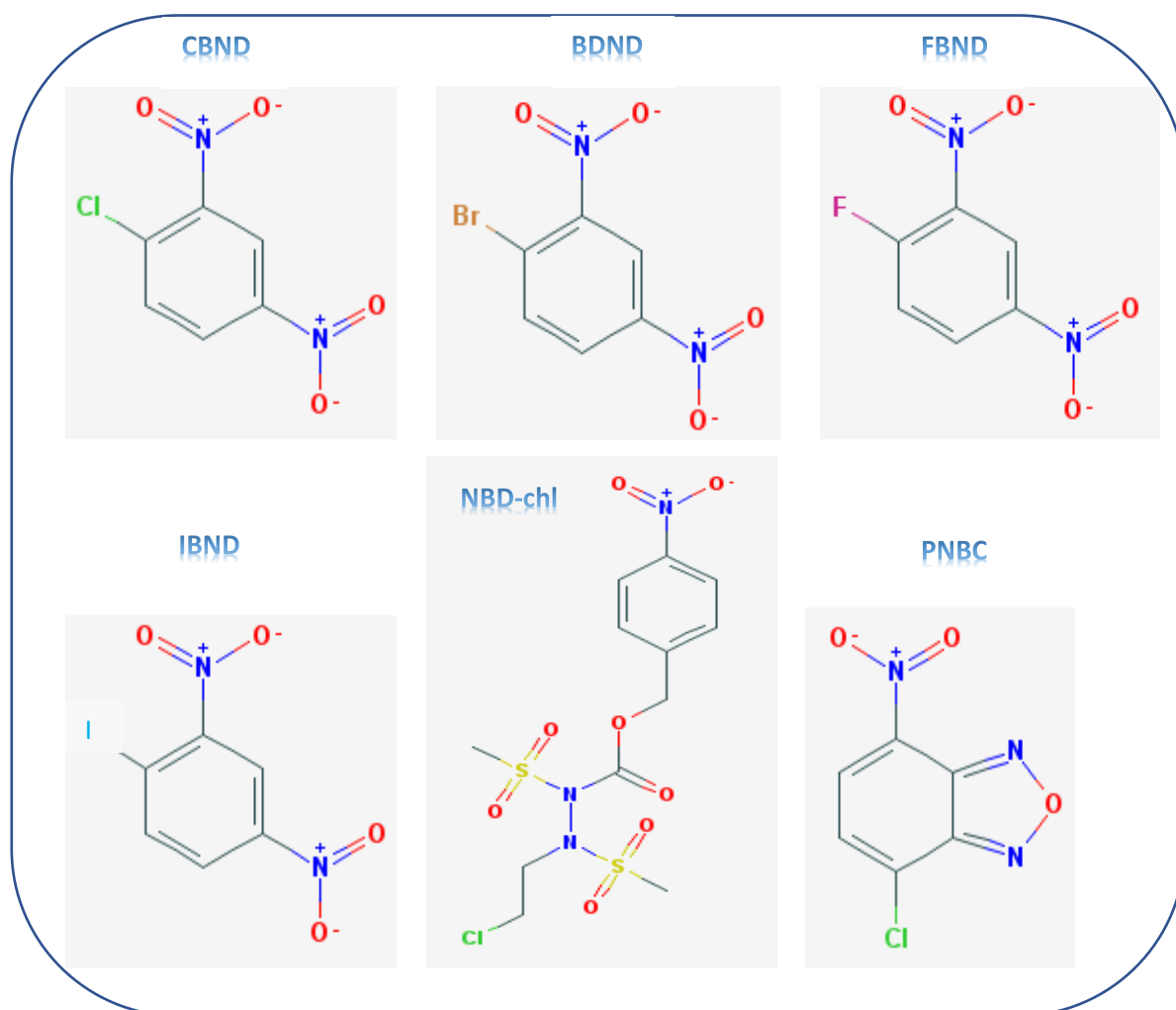
Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενζύμου γίνεται μέσω του προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας. Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της GST βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου της GSH με το GS-CDNB (Σχήμα 2.1) (Labrou *et al.*, 2001). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, οφειλόμενη στο σχηματισμό του προαναφερθέν συμπλόκου. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο § 2.2.15.



Σχήμα 2.1: Ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου από την σουλφιδρυλομάδα της GSH και δημιουργία του συμπλόκου GS-CDNB. Οι δομές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα ChemBio Draw Ultra, Perkin Elmer.

Η διαδικασία μέτρησης της δραστηριότητας της GST με τα αλογωνομένα νιτροβενζόλια BDNB, FDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl είναι παρόμοια με αυτή που εφαρμόζεται για το πρότυπο υπόστρωμα των ενζύμων GSTs, το CDNB (Εικόνα 2.5) (Labrou *et al.*, 2001).

Η γενική αντίδραση η οποία ακολουθείται είναι η εξής:



Εικόνα 2.5: Δομές των αλογωμένων νιτροβενζολίων (PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Για να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα των GSTs με τα υποστρώματα IDNB, FDNB, BDNB οι μετρήσεις γίνονται στα 340 nm (Skopelitou *et al.*, 2011), όπου και απορροφά το σύμπλοκο ενώ για το υπόστρωμα PNBC γίνονται στα 310 nm και για το NBD-Cl στα 420 nm (Axarli *et al.*, 2009a).

Αναλυτικότερα, σε μια δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας για τα αλογωνομένα νιτροβενζόλια (BDNB, FDNB, IDNB), χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα (stock) :

- Ρυθμιστικό διάλυμα: KH_2PO_4 , 0,1 M, pH 6,5
- GSH: 75 mM σε δις απιονισμένο νερό
- BDNB/FDNB/IDNB: 30 mM σε αιθανόλη
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος).

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, προσθέτουμε το αλογωμένο νιτροβενζόλιο, τη GSH, ανακινούμε και τέλος την κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος. Αναλυτικότερα, οι όγκοι για μια τυπική φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας έχουν ως εξής:

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	934	934 - x (*)
BDNB/FDNB/IDNB	33	33
GSH	33	33
Ένζυμο	-	x (*)
Συνολικός όγκος	1000	1000

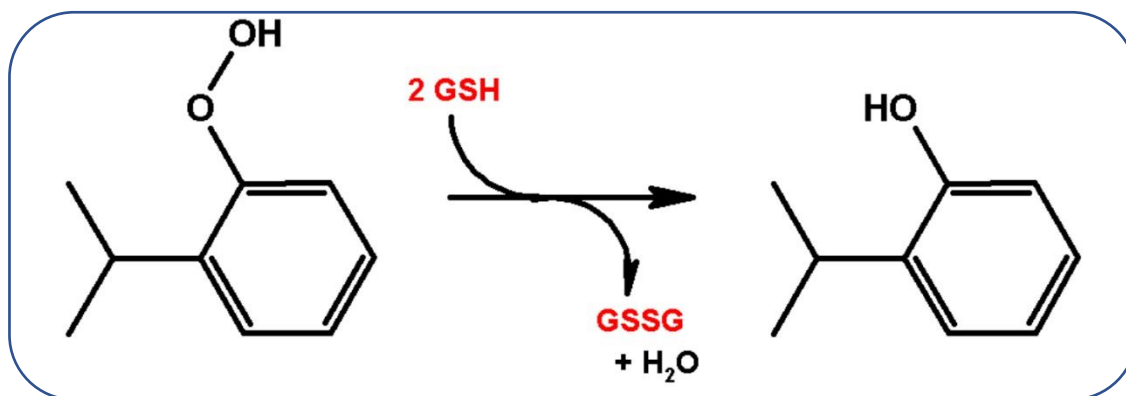
(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

Επιπλέον, για το PNBC (1 mM) η συγκέντρωση της GSH ανέρχεται στα 5 mM ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης είναι 0,1 M KH_2PO_4 -1 mM EDTA pH 6,5. Τέλος, για το NBD-Cl (0,2 mM) η συγκέντρωση της GSH απαντάται σε 0,5 mM και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης είναι το 0,1 M CH_3COONa pH 5.

2.2.27 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH), το t-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tert-BuOOH) και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο (Benzoyl peroxide)

Για να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα των GSTs με το CuOOH , το tert-BuOOH και το Benzoyl peroxide (Εικόνα 2.6, 2.7), ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται από τον Tappel, 1978. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και προσδιορίζεται η ταχύτητα μετατροπής του NADPH σε NADP^+ , σε μήκος κύματος 340

nm και συντελεστή απόσβεσης $\epsilon=6,22 \text{ L/mmole}\cdot\text{cm}$.



Εικόνα 2.6: Αντίδραση του υπεροξειδίου του κουμηνίου με τις GSTs (http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/gst.html).

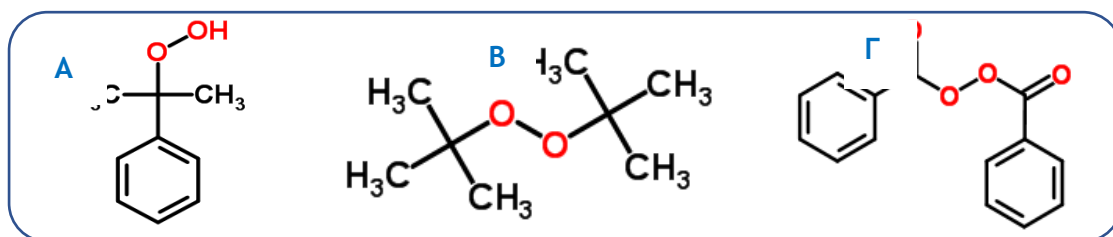
Πιο συγκεκριμένα, σε μια δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα (stock) :

- Ρυθμιστικό διάλυμα: KH_2PO_4 0,1 M-EDTA 1 mM, pH 7,5
- GSH: 1 mM σε δις απιονισμένο νερό
- $\text{CuOOH}/\text{tert-BuOOH}/\text{Benzoyl peroxide}$: 1,5 mM σε αιθανόλη
- NADPH: 0,2 mM σε δις απιονισμένο νερό
- Ρεδοκτάση της GSH: 1 μL (1 U)
- Ένζυμο: αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος).

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, προσθέτουμε το υδροϋπεροξείδιο, τη GSH, το NADPH και ανακινούμε. Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος την ρεδοκτάση της GSH. Αναλυτικότερα, οι όγκοι για μια τυπική φασματοσκοπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας έχουν ως εξής:

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	561	561 - x (*)
Υδροϋπεροξειδία	30	30
GSH	8	8
NADPH	12	12
Ένζυμο	-	x (*)
Grd	1	1
Συνολικός όγκος	600	600

(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.



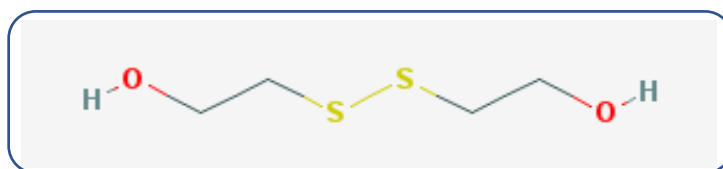
Εικόνα 2.7: Δομές των υπεροξειδίων, (A) CuOOH, (B) Tetr-BuOOH, (Γ) Benzoyl peroxide (<http://www.chemspider.com/>).

2.2.28 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)

Η GST καταλύει την αντίδραση της αναγωγής του DHA σε ασκορβικό, χρησιμοποιώντας την ανοιγμένη GSH ως δότη ηλεκτρονίων. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις γίνονται στα 265 nm, με μοριακό συντελεστή απόσβεσης 6,22 L/mmol·cm. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL έχοντας GSH 1 mM, DHA 0,25 mM και ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM KH_2PO_4 , pH 8.

2.2.29 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο 2-2-διθειοδιαιθανόλη (HED)

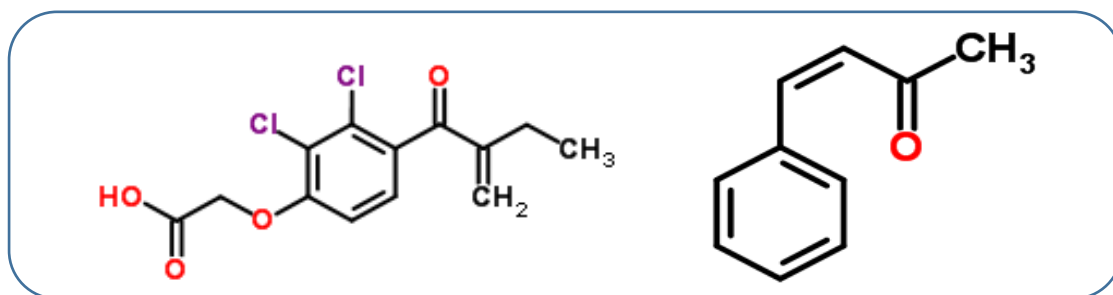
Για να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα της GST ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται από τον Wilson *et al.*, 1989. Η αντίδραση πραγματοποιείται με GSH 0,5 mM, HED 2 mM, NADPH 0,2 mM, ρεδοκτάση της GSH 0,5 U σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-Cl, pH 7,8 (Εικόνα 2.8). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 mL και έχει ως μοριακό συντελεστή απόσβεσης την τιμή 6,22 L/mmol·cm.



Εικόνα 2.8: Δομή 2-2-διθειοδιαιθανόλης (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.30 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια αιθακρινικό οξύ (EA) και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι του EA βασίστηκε στη φωτομετρική μέθοδο του Satoh, 1995 ενώ της trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη στη μέθοδο του Habig *et al.*, 1974. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, περιέχει GSH 0,25 mM και EA 0,2 mM (σε ακετόνη) ή trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη 0,05 mM (σε αιθανόλη) σε ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 0,1 M, pH 6,5 (Εικόνα 2.9). Οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης είναι 5 L/mm \cdot cm και -24,8 L/mm \cdot cm αντίστοιχα. Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί διεξάγονται σε μήκος κύματος 270 nm για το EA και 290nm για την τρανς-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη στους 37 °C.



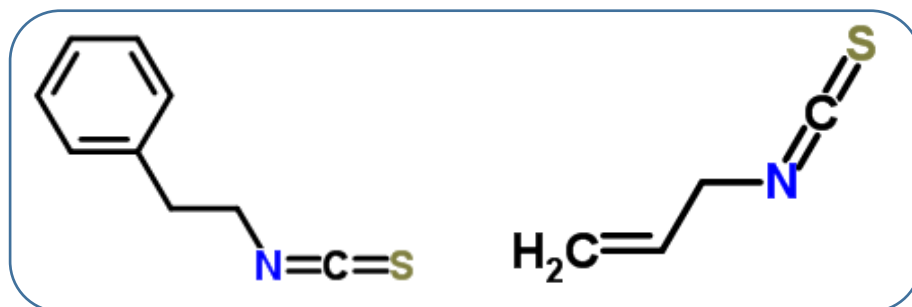
Εικόνα 2.9: Δομές αιθακρινικού οξέος και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνης (<http://www.chemspider.com/>).

2.2.31 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP)

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι της BSP βασίστηκε στη φωτομετρική μέθοδο του Javitt *et al.*, 1960. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 mL και περιλαμβάνει GSH 5 mM, BSP 0,03 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης είναι 4,5 L/mm \cdot cm και ο προσδιορισμός διεξάγεται σε μήκος κύματος 330 nm.

2.2.32 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC)

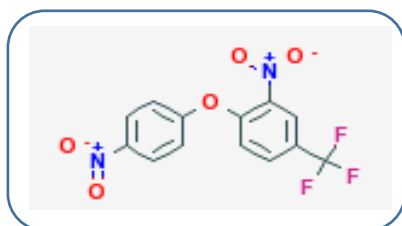
Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι των ισοθειοκυανικών ενώσεων βασίστηκε στη μέθοδο των Meyer *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 1996. Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης είναι δέκα min και πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL και περιλαμβάνει GSH 1 mM, PEITC και AITC 0,4 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 (Εικόνα 2.10). Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης είναι αντίστοιχα 8,89 L/mm \cdot cm και 7,45 L/mm \cdot cm αντίστοιχα και ο προσδιορισμός διεξάγεται σε μήκος κύματος 274 nm.



Εικόνα 2.10: Δομές ισοθειοκυανικού φαινυλαιθυλ-εστέρα και ισοθειοκυανικού αλλυλ-εστέρα (<http://www.chemspider.com/>).

2.2.33 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο fluorodifen

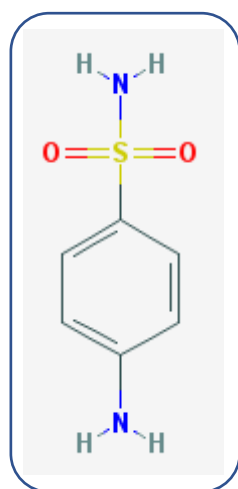
Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι του Fluorodifen βασίστηκε στη μέθοδο του Dixon *et al.*, 2003. Η συνολική διάρκεια επώασης της αντίδρασης είναι μία ώρα και πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL και περιλαμβάνει GSH 5 mM, fluorodifen 0,05 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Glycine-NAOH, pH 9,5 (Εικόνα 2.11). Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης είναι αντίστοιχα 18,5 L/mm \cdot cm και ο προσδιορισμός διεξάγεται με απορρόφηση σε μήκος κύματος 400 nm.



Εικόνα 2.11: Δομή fluorodifen (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.34 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σουλφανιλαμίδη

Η συνολική διάρκεια επώασης της αντίδρασης είναι δεκαπέντε min και πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL και περιλαμβάνει GSH 1 mM, σουλφανιλαμίδη 1 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5 (Εικόνα 2.12). Στην αντίδραση προστίθεται το αντιδραστήριο Nessler καθώς η αντίδραση βασίζεται στην απελευθέρωση αμμωνίας. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης είναι 4,23 L/mmol·cm και ο προσδιορισμός διεξάγεται με απορρόφηση σε μήκος κύματος 400 nm.

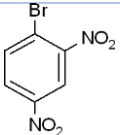
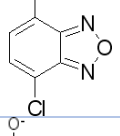
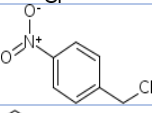
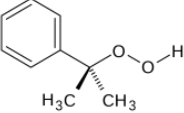
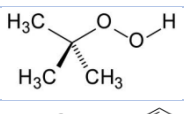
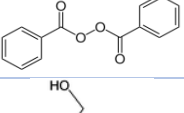
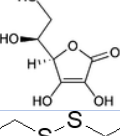
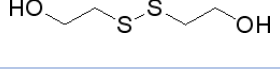
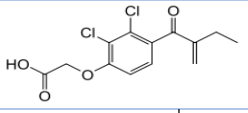
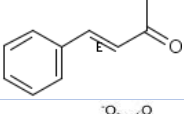
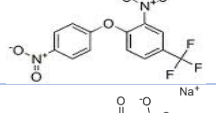
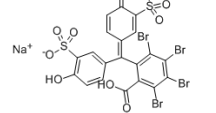
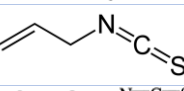
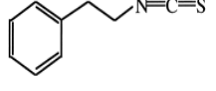
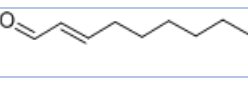


Εικόνα 2.12: Δομή σουλφανιλαμίδης (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Στη συνέχεια παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας των συνθηκών με τις οποίες δοκιμάστηκαν όλα τα υποστρώματα.

Πίνακας 2.2: Συγκεντρωτικός πίνακας με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες ελέγχθηκαν τα υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Δομή υποστρώματος	Συγκέντρωση υποστρώματος/ διαλύτη	GSH (mM)	pH	λ (nm)	Συντελεστής μοριακής απόσβεσης σε (L/mmol·cm)
1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο		1 mM/ αιθανόλη	2,5	6,5	340	9,6
1-ιοδο-2,4-δινιτροβενζόλιο		1 mM/ αιθανόλη	2,5	6,5	340	9,6
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο		1 mM/ αιθανόλη	2,5	6,5	340	9,6

1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο		1 mM/ αιθανόλη	2,5	6,5	340	9,6
4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο		0,2 mM/ αιθανόλη	0,5	5	420	14,5
π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο		1 mM/ αιθανόλη	5	6,5	310	1,9
υδροϋπεροξειδιο του κουμενίου		1,5 mM/ αιθανόλη	1	7,5	340	6,22
t-βουτυλο-υδροϋπεροξειδιο		1,5 mM/ αιθανόλη	1	7,5	340	6,22
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδιο		1,5 mM/ νερό	1	7,5	340	6,22
διυδροασκορβικό οξύ		0,25 mM/ νερό	1	8	265	6,22
2-2-διθειοδιαιθανόλη		2 mM/ νερό	0,5	7,8	340	6,22
Αιθακρινικό οξύ		0,2 mM/ αιθανόλη	0,25	6,5	270	5
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη		0,05 mM/ νερό	0,25	6,5	290	-24,8
fluorodifen		0,05 mM/ ακετόνη	5	9,5	400	18,5
Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη		0,03 mM/ νερό	5	6,5	330	4,5
ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας		0,4 mM/ αιθανόλη	1	6,5	274	7,45
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας		0,4 mM/ αιθανόλη	1	6,5	274	8,89
trans-2-ενενάλη		0,1 mM/ αιθανόλη	0,5	6,5	224	13,75

2.2.35 Κινητική ανάλυση και υπολογισμός μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) και σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) ως προς το υπόστρωμα ενός ενζύμου

Η πειραματική διαδικασία του προσδιορισμού της σταθεράς *Michaelis Menten* (K_m), καθώς και της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) μιας υποστρωματικής αντίδρασης

περιλαμβάνει το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας υπό μεταβαλλόμενη συγκέντρωση του μελετώμενου υποστρώματος (1.1). Η συγκέντρωση του μελετώμενου υποστρώματος μπορεί να λάβει ένα καθορισμένο εύρος τιμών. Κατά την πραγματοποίηση των προσδιορισμών, όλες οι παράμετροι (όγκος, θερμοκρασία, χρόνος προσδιορισμού, συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, pH) διατηρούνται σταθερές.

Ο προσδιορισμός των τιμών V_{max} και K_m γίνονται βάσει της εξίσωσης των Michaelis-Menten:

$$u_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (1.1)$$

όπου u_0 : η υπολογιζόμενη ταχύτητα της αντίδρασης κάθε στιγμή
 $[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος που χρησιμοποιείται

Οι τιμές της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης οι οποίες λαμβάνονται, μεταφέρονται σε ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας στο οποίο πραγματοποιείται επεξεργασία των δεδομένων και προκύπτει η γραφική παράσταση της εξίσωσης *Michaelis Menten*.

2.2.36 Προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC50)

Για τον υπολογισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης του αναστολέα, η οποία είναι ικανή να προσδώσει αναστολή 50 % (*IC₅₀, half maximal Inhibitory Concentration*) σε ένα μελετώμενο ένζυμο, πραγματοποιούνται δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας. Οι δοκιμές είναι φασματοφωτομετρικές και χαρακτηρίζονται από σταθερές συγκεντρώσεις των βασικών υποστρωμάτων και τη μεταβαλλόμενη συγκέντρωση του μελετώμενου αναστολέα. Το αποτέλεσμα της κάθε δοκιμής κρίνεται βάσει της δοκιμής αναφοράς και υπολογίζεται το RA % στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα. Τα αποτελέσματα, στη συνέχεια, μεταφέρονται ως δεδομένα σε ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων, όπου με τη χρήση των κατάλληλων παραμέτρων υπολογίζεται η τιμή της ζητούμενης συγκέντρωσης που δίνει 50 % αναστολή.

2.2.37 Σάρωση ξενοβιοτικών ενώσεων ως δυνητικών αναστολέων GST ισοενζύμων

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι ξενοβιοτικές ενώσεις ως δυνητικοί αναστολείς των GST ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος για την ικανότητά τους να δρουν

ως αναστολείς της δραστηριότητας του ισοενζύμου που εξετάζεται σε κάθε περίπτωση. Η μελέτη διεξήχθη κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες :

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	924	924-x(*)
CDNB (30 mM)	33	33
GSH (75 mM)	33	33
Αναστολέας (10 mM)	10	10
Ένζυμο	-	x (*)
Συνολικός όγκος	1000	1000

(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

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

2.2.38 Μέθοδος in vitro κατευθυνόμενης ενζυμικής εξελίξης (Τεχνική DNA Shuffling)

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξελίξεως, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που ανέπτυξαν οι Zhao and Arnold, 1997 και περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.

2.2.39 Θερμική σταθερότητα ενζύμου (T_m)

Για τη μελέτη αυτή, επωάζεται κατάλληλη ποσότητα ενζύμου στην επιθυμητή θερμοκρασία για 5 min. Η δραστηριότητα προσδιορίζεται σύμφωνα με τη φασματοφωτομετρική διαδικασία που αναλύεται στην § 2.2.15. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται η τιμή της T_m δηλαδή η θερμοκρασία που παρατηρείται απώλεια του 50 % της συνολικής δραστηριότητας.

2.2.40 Ανάλυση βιοπληροφορικής και μοριακή μοντελοποίηση

Για την απεικόνιση των μοντέλων έγινε χρήση των προγραμμάτων PyMOL (<http://www.pymol.org/>, DeLano 2002), UCSF Chimera, HPN@NIH, και WhatIf.

2.2.41 Διαφορική φασματοσκοπία φθορισμού (DSF)

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα που μας περιγράφει η εταιρία *Applied Biosystems* και περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.

Κεφάλαιο 3

*Κατευθυνόμενη εξέλιξη GST
ισοενζύμων της ται τάξης*

3.1 Εισαγωγή

Για το δομικό ανασχεδιασμό ενζύμων χρησιμοποιούνται μέθοδοι πρωτεϊνικής μηχανικής. Ως ‘πρωτεϊνική μηχανική’ περιγράφεται το σύνολο των διαδικασιών όπου χρησιμοποιεί η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA για την τροποποίηση των καταλυτικών, δομικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών (Santos and Aberturas, 2018). Ο απώτερος σκοπός της πρωτεϊνικής μηχανικής είναι η βελτίωση των λειτουργιών των πρωτεϊνών ώστε να διευρυνθούν και να μεγιστοποιηθούν οι βιοτεχνολογικές τους εφαρμογές (Alcalde, 2017). Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA καθιστά πλέον εφικτή την ανάπτυξη τεχνικών για τη δημιουργία συγκεκριμένων μεταλλάξεων *in vitro*. Με τις τεχνικές αυτές επιτυγχάνεται συγκεκριμένη τροποποίηση της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης έτσι ώστε το νέο μεταλλαγμένο μόριο που προκύπτει να έχει τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που επιθυμούμε (Karoor *et al.*, 2017).

Οι κύριες προσεγγίσεις που εφαρμόζονται για να επιτύχουμε τις παραπάνω τροποποιήσεις είναι αφενός μεν ο *ορθολογικός σχεδιασμός* πρωτεϊνών και αφετέρου η *κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη* (Alcalde, 2017). Κατά τη διάρκεια του *ορθολογικού σχεδιασμού* πρωτεϊνών, οι μεταλλάξεις σχεδιάζονται με βάση την πρωτεϊνική τους δομή και στη συνέχεια πραγματοποιούνται με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση (Gard *et al.*, 2017; Gerhke *et al.*, 2018). Μετασχηματίζονται, εκφράζονται, καθαρίζονται και μελετώνται για την εύρεση των επιθυμητών ιδιοτήτων. Από την άλλη, η *κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη* ξεκινά με την προετοιμασία βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων γονιδίων που προήλθαν από τυχαία μεταλλαξογένεση και οι οποίες, στη συνέχεια, εκφράστηκαν και ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας μια σειρά από παραμέτρους επιλογής (Hellings and Allert, 2018; Mügge and Kourist, 2018). Τέλος, και οι δύο προσεγγίσεις πρωτεϊνικής μηχανικής μπορούν να συνδυαστούν ώστε να προκύψουν τα ισόενζυμα με τις επιθυμητές ιδιότητες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεϊνικής μηχανικής σε GSTs έχει παρουσιαστεί από την Acharli και τους συνεργάτες της όπου δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη, μέσω κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης, με τη χρήση τριών τάξεων των GSTs από την *Glycine max* (*GmGSTU2-2*, *GmGSTU4-4* και *GmGSTU10-10*). Οι συγγραφείς ταυτοποίησαν μια μετάλλαξη όπου παρουσίαζε περίπου 10-φορές υψηλότερη δραστικότητα αποτοξικοποίησης έναντι του CDNB και του fluorodifen και μια

ασυνήθιστη συνεργιστική κινητική προς CDNB και fluorodifen. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση αυτής της μεταλλαγμένης μορφής του ενζύμου με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και έδειξε ότι η σημειακή μετάλλαξη Trp114Cys ήταν υπεύθυνη για τις παραπάνω ιδιότητες. Αναλυτικότερα, η αντικατάσταση της Trp από τη μικρότερη Cys, προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της κοιλότητας του ενεργού κέντρου που επιτρέπει την ενίσχυση των δύο γεφυρών άλατος μεταξύ των Glu66 και Lys104. Αυτή η αλλοιωμένη αλληλεπίδραση πυροδοτεί ένα αλλοστερικό αποτέλεσμα και ενισχύει την επικοινωνία μεταξύ των Η-θέσεων των γειτονικών υπομονάδων (Acharli *et al.*, 2016).

Ένα άλλο ενδιαφέρον παράδειγμα σε GSTs αποτελεί η μελέτη του Labrou και των συνεργατών του όπου με τη χρήση της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης τροποποίησαν τρία αμινοξέα της Η-θέσης (Trp12, Phe35 και Ile118) της οικογένειας *phi* GSTI από *Zea mays* προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβολή τους στη δέσμευση του υποστρώματος και στην κατάλυση (Labrou *et al.*, 2004). Οι συγγραφείς έδειξαν ότι τα τρία αμινοξέα επηρεάζουν την καταλυτική αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση του ενζύμου έναντι διαφορετικών ξενοβιοτικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων.

Ο χειρισμός της ικανότητας αποτοξίνωσης από φυτικές GSTs αγροχημικών και των άλλων ξενοβιοτικών έχει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και παράλληλα, δίνει χρήσιμες γνώσεις σχετικά με το μηχανισμό αντίστασης που βασίζεται στο μεταβολισμό στα φυτοφάρμακα και τους ρύπους (Kissoudis *et al.*, 2015; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Οι *tau* και *phi* οικογένειες των GSTs είναι υπεύθυνες για την αντίδραση της GSH με φυτοφάρμακα και έχουν ένα καλά εδραιωμένο ρόλο στον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας των ζιζανιοκτόνων στις καλλιέργειες και τα ζιζάνια (Pavlidι *et al.*, 2018). Επομένως, αυτές οι οικογένειες των GSTs αποτελούν σημαντικούς στόχους στη γεωπονική φαρμακολογία (Skopelitou *et al.*, 2017).

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Βιολογικά υλικά

Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το κεφάλαιο δημιουργήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας από τη Δρ. Αξαρλή μέσω της διαδικασίας της ενζυμικής κατευθυνόμενης εξέλιξης (Axarli *et al.*, 2016). Την πατρική γενεά αποτέλεσαν τα ένζυμα *GmGSTU2-2*, *GmGSTU4-4* και *GmGSTU10-10*. Τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν πάνω από 88 % ομολογία μεταξύ τους. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες που προέκυψαν αποτελούνται τόσο από εναλλαγές κομματιών των πατρικών γονιδίων όσο και από σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν από τα λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

3.2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μαλεϊμίδιο από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

Διάλυμα θειοκυανιούχου υδραργύρου 0,1 % (w/v)

Ποσότητα 0,1 g $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ διαλύεται σε 100 mL αιθανόλης με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε απαγωγό εστία. Μετά τη διάλυση το αντιδραστήριου, το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 h και φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο. Έπειτα διηθείται, μεταφέρεται πάλι σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα νιτρικού σιδήρου 6 % (w/v)

Ποσότητα 6 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ζυγίζεται και διαλύεται σε 100 mL διαλύματος υπερχλωρικού οξέος και δις απιονισμένου νερού σε αναλογία 1:1. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε απαγωγό εστία και στη συνέχεια, το δοχείο του διαλύματος φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο και αφήνεται σε ηρεμία για 24 h. Την επόμενη ημέρα, διηθείται, μεταφέρεται πάλι σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

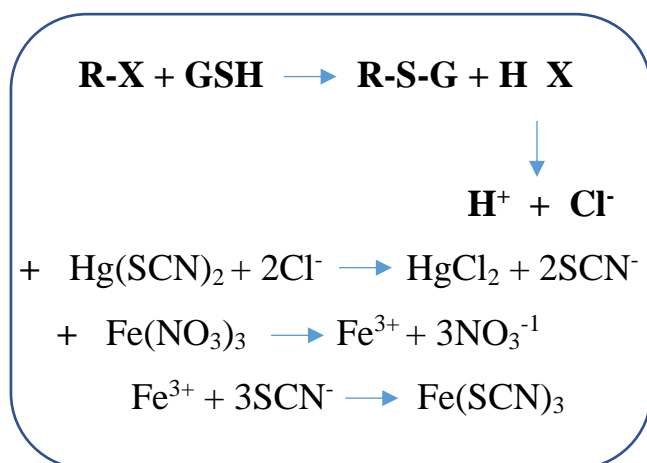
Διάλυμα υπερχλωρικού οξέος (HClO_4) σε αναλογία 1:1

Το υπερχλωρικό οξύ διατίθεται σε διάλυμα 70 % v/v. Αναμιγνύεται 1 όγκος 70 % v/v HClO_4 με ένα όγκο δις απιονισμένου νερού έως συνολικού όγκου 100 mL.

3.2.2 Μέθοδοι

3.2.2.1 Προσδιορισμός αντίδρασης GSH με alachlor

Η φωτομετρική αυτή μέθοδος προσδιορισμού στηρίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αλογόνου να αντικαθιστούν τα θειοκυανικά από τα σύμπλοκά τους με τα ιόντα υδραργύρου. Τα θειοκυανικά που ελευθερώνονται αντιδρούν ποσοτικά με ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) προς το σχηματισμό ενός σκούρου κόκκινου συμπλόκου $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 460 nm (Σχήμα 3.1). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5 που περιέχει GSH, alachlor και κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 25 °C για 60 min και η ποσότητα της GSH που δεν έχει συμπλοκοποιηθεί με το υπόστρωμα αδρανοποιείται προσθέτοντας στην αντίδραση 10 μL μαλειμίδιο (100 mM). Η αδρανοποίηση αυτή επιτυγχάνεται με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Ακολούθως, 100 μL της αντίδρασης χρησιμοποιούνται για το φωτομετρικό προσδιορισμό των Cl^- . Αρχικά αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 1 mL με δις απιονισμένο νερό και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ποσότητα $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ (0,1 % w/v) και $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (6 % w/v). Το τελικό διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min και στη συνέχεια λαμβάνεται η απορρόφηση στα 460 nm (Skopelitou *et al.*, 2011).



Σχήμα 3.1: Αντίδραση προσδιορισμού αλογονοϊόντων με τη μέθοδο θειοκυανιούχου υδραργύρου.

Πρωτόκολλο ποσοτικού προσδιορισμού αλογονοϊόντων

Σε τρεις κυψελίδες (1 mL) τοποθετούνται τα αντιδραστήρια ως εξής:

Αντιδραστήρια (μL)	Μάρτυρας 1	Μάρτυρας 2	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα	86,7	86,7	86,7-x (*)
GSH	3,3	3,3	3,3
Alachlor	10	-	10
Ένζυμο	-	x	x (*)

(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

3.2.2.2 Μέθοδος in vitro κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης (Τεχνική DNA Shuffling)

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Zhao and Arnold, 1997.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Αρχικά πλασμιδιακό DNA από επτά επιλεγμένες αποικίες υποβλήθηκε σε πέψη σε μικρά κομμάτια, 50-100 bp, έπειτα από κατεργασία με DNase σε τελικό όγκο 50 μL. Αναλυτικότερα, αναμιγνύουμε 4 μL από κάθε έναν από τα επτά πλασμίδια με κλωνοποιημένα ένζυμα (Se 7, Se 12, Se 22, Se 23, Se26, Se32, Se34) με 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος DNase και 13 μL διάλυμα εξισορρόπησης TE. Τέλος, προσθέτουμε 0,7 μL DNase (2U/μL). Χωρίζουμε το μίγμα σε επτά ίσες ποσότητες και ακολουθεί εξισορρόπηση στους 15 °C για 15 min. Στους χρόνους t=0, t=2, t=4, t=6, t=8, t=10 και t=15 min πραγματοποιήθηκε παύση της αντίδρασης, προσθέτοντας 1 μL διάλυμα παύσης (διακόπτει τη δράση της DNase) και ακολουθεί επώαση στους 65 °C για 10 min. Μετά το πέρας του δεκάλεπτου ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2 %. Έπειτα, επανασυνδέουμε τα κομμάτια των 50-100 bp με PCR. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχε:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
10x διάλυμα αντίδρασης	5
dNTPs (50 mM)	0,6
Kapa High-Fidelity πολυμεράση	1
Μήτρα (2 μL από τους χρόνους 6, 8, 10, 15 min)	8
Αποστειρωμένο νερό	35,4
Τελικός όγκος	50

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έγινε η PCR είναι οι ακόλουθες:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 95 °C για 3 min
<i>40 Κύκλοι</i>	Αποδιάταξη στους 95 °C για 30 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 50 °C για 1 min
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Τέλος, πραγματοποιήθηκε PCR των συναρμολογημένων κομματιών, με τους εκκινητές του άγριου τύπου του ενζύμου *GmGSTU4-4* με μήτρα το προϊόν της PCR που πήραμε από την παραπάνω αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχε:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
10x διάλυμα αντίδρασης	5
dNTPs (50 mM)	0,6
5' GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGT GAT GAG GTA GTG TT 3' (10 pmol/μL)	0,6
5' GTG ATG GTG GTG ATG ATG CTA CTC AAT GCC TAA CTT 3' (10 pmol/μL)	0,6
Kapa High-Fidelity πολυμεράση	1
Μήτρα	2
Αποστειρωμένο νερό	40,2
Τελικός όγκος	50

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έγινε η PCR είναι οι ακόλουθες:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 95 °C για 3 min
<i>40 Κύκλοι</i>	Αποδιάταξη στους 95 °C για 30 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 50 °C για 90 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Τέλος, το αποτέλεσμα της PCR υπόκειται σε κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pETite™ σύμφωνα με την παράγραφο § 2.2.24 και το υλικό στρώθηκε σε τρυβλία Petri με αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 µg/mL), όπου στη συνέχεια ακολούθησε σάρωση για την απομόνωση κλώνων με την επιθυμητή δραστηριότητα.

3.2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των μεταλλαγμένων γονιδίων

Οι απομονώσεις του πλασμιδιακού DNA των γονιδίων που προέκυψαν από τη μέθοδο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του MiniPlasmid isolation kit της εταιρίας Macherey-Nagel.

3.2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ελέγχου αποικιών *E. coli* (Colony PCR)

Οι αποικίες τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου erpendorf χωρητικότητας 0,2 mL σε τελικό όγκο 25 µL και περιείχε:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (µL)
10x διάλυμα αντίδρασης	2,5
dNTPs (50 mM)	0,5
5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' (8 pmol/µL)	1
5' CTC AAG ACC CGT TTA GAG GC 3' (8 pmol/µL)	1
Kapa Taq πολυμεράση	0,2
Μήτρα	Εμβολιασμός από την αποικία
Απιονισμένο νερό	19,8
Τελικός όγκος	25

Οι συνθήκες που ακολούθηθηκαν είναι οι εξής:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 95 °C για 5 min
<i>30 Κύκλοι</i>	Αποδιάταξη στους 95 °C για 30 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 54 °C για 30 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1:20 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 5 min

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης και οι αποικίες που έδωσαν θετικό σήμα, χρησιμοποιήθηκαν για προκαλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

3.2.2.5 Ετερόλογη έκφραση των ισοενζύμων GST σε βακτήρια *E. coli* του στελέχους HI-Control BL21 (DE3) (SOLOs)

Για την έκφραση των νέων μεταλλαγμένων ισοενζύμων sh4, sh15 και sh19 μετασχηματίστηκαν κύτταρα από τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli*, HI-Control BL21 (DE3) (SOLOs). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν: 1 % (w/v) πεπτόνη, 1 % (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50 mL) προσθέτουμε ως αντιβιοτικό επιλογής καναμυκίνη (30 mg/mL) για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pETite™ καθώς και ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37 °C για 14-16 h υπό συνεχή ανάδευση, στις 180 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 μL σε φιαλίδιο τύπου erpedorf όπου και στη συνέχεια προστίθενται 500 μL διάλυμα γλυκερόλης 50 % (v/v). Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί ωσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80 °C. Μετά το πέρας, προστίθεται το αντίστοιχο αντιβιοτικό στη μεγάλη κωνική (450 mL), εμβολιάζω με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας και την τοποθετώ στον επωαστήρα, στους 37 °C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) (1 mM) όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών είναι 0,6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4 h. Έπειτα, μεταφέρεται η καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να γίνει συλλογή της πάστας με φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4 °C για 20 min.

3.2.2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bradford που περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.14.

3.2.2.7 Καθαρισμός των GST ισοενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας

Επαναιωρούμε τα κύτταρα της κυτταρικής ‘πάστας’ σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 20 mM, pH 7 και θραύουμε τα κύτταρα με χρήση συσκευής υπερήχων έχοντας εμβαπτισμένο το κυτταρικό αιώρημα σε παγόλουτρο. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το επιθυμητό γονίδιο χρειάστηκαν τέσσερις έως πέντε επαναλήψεις των 10 s η καθεμία για τη θραύση (λύση) των κυττάρων. Φυγοκεντρούμε το τελικό αιώρημα στις 13.000 rpm για 15 min και συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια προσδιορίζουμε φωτομετρικά την ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας το σύστημα GSH/CDNB (§ 2.2.15), ως επίσης και τη συνολική πρωτεΐνη (μέθοδος Bradford) (§ 2.2.14). Ακολούθησε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (20 mM, pH 7) για 18-24 h και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο (§ 2.2.13) Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (14 % SDS-PAGE), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.21).

3.2.2.8 Προσδιορισμός της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων με ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα

Για τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4 δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl) καθώς και το fluorodifen χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένες μέθοδοι (Axarli *et al.*, 2009a, Skopelitou *et al.*, 2011) οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά σε παραγράφους προηγούμενου κεφαλαίου (§ 2.2.26 και § 2.2.33). Προσδιορισμός της δράσης υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε με φωτομετρικές δοκιμές με υδρο-υπεροξειδία (CuOOH, tert-BuOOH, benzoyl peroxide) οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στην § 2.2.27. Οι δοκιμές για τη 2-2 διθειοδιαιθανόλη (HED), το διϋδροασκορβικό οξύ, το αιθακρινικό οξύ (EA), την trans-4φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, τη βρωμοσουλφοφθαλείνη, την trans-2 ενενάλη, και τους ισοθειοκυανικούς εστέρες

(PEITC και AITC) περιγράφονται αναλυτικά στις § 2.2.28, § 2.2.29, § 2.2.30, § 2.2.31 και § 2.2.32.

3.2.2.9 Κινητική μελέτη των ισοενζύμων για το σύστημα CDNB/GSH

Κινητική μελέτη των ισοενζύμων έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων sh4, sh15 και sh19 (§ 2.2.35), έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, GSH σε σταθερή συγκέντρωση και CDNB μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 15 - 1.400 μM για το sh4, 5 - 1.400 μM για το sh15 και 22.5 - 1.400 μM για το sh19. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη των ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων sh4, sh15 και sh19 (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, CDNB σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 10 - 3.000 μM για το sh4, 3 - 3.000 μM για το sh15 και 10 - 3.000 μM για το sh19. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής

σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

3.2.2.10 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης για τις μεταλλαγμένες μορφές

Μελετήθηκε η εξάρτηση της ταχύτητας των ισοενζύμων sh4, sh15, sh19, shII5, shII6 και shII7 σε θερμοκρασιακό εύρος που κυμαινόταν από τους 4 °C έως 90 °C. Για τη μελέτη αυτή, καθαρίστηκαν οι μορφές με χρωματογραφία συγγένειας και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση σε ρυθμιστικό ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (0,1 M, pH 6,5). Αναλυτικότερα, η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την επώαση κατάλληλου ενζυμικού δείγματος για χρονικό διάστημα 5 min σε επιλεγμένες θερμοκρασίες εντός του προαναφερθέντος θερμοκρασιακού εύρους και στη συνέχεια, τον προσδιορισμό της παραμένουσας δραστηριότητας του ενζύμου χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH, όπου περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.15. Η δραστηριότητα στους 4 °C θεωρήθηκε ως το 100 % ώστε να προσδιοριστεί η υπολειπόμενη δραστηριότητα για τις άλλες θερμοκρασίες.

3.2.2.11 Κινητική ανάλυση της δομικής σταθερότητας των GST μορφών σε σχέση με το χρόνο

Μια προσέγγιση για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη δομική σταθερότητα είναι μέσω της σχέσης του *Arrhenius* (3.1). Η εξίσωση *Arrhenius* περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας (T) στη μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}) και δίνεται από την εξίσωση:

$$V_{max} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (3.1)$$

Όπου:

V_{max} : είναι η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

A: η σταθερά *Arrhenius* ή ο παράγοντας συχνότητας

E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης

R: η σταθερά των αερίων (8,314 J/mol·K)

T: η απόλυτη θερμοκρασία (K)

Κατάλληλη ποσότητα καθαρού ενζυμικού παρασκευάσματος παρέμεινε για χρονικό διάστημα t σε καθορισμένη σταθερή θερμοκρασία. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν είναι οι εξής 50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλους χρόνους με ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 0,1 M και pH 6,5 χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH (§ 2.2.15). Όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7.

Επίσης, μελετήθηκαν οι μεταβολές της ενθαλπίας (ΔH^\ddagger) και της εντροπίας (ΔS^\ddagger) της αντίδρασης, με τη βοήθεια της εξίσωσης του *Eyring* (3.2) (Fan *et al.*, 2000). Σύμφωνα με τη θεωρία της *μεταβατικής κατάστασης* του *Eyring*, η εξάρτηση της σταθεράς κατάλυσης (k_{cat}) από τη θερμοκρασία (T) δίνεται από την εξίσωση:

$$\ln \frac{k_{cat}}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (3.2)$$

Όπου:

k_{cat} : είναι η μέγιστη ταχύτητα

T: η απόλυτη θερμοκρασία (K)

ΔH^\ddagger : η μεταβολή της ενθαλπίας ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

R: η σταθερά των αερίων ($8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$)

k_B : η σταθερά του Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)

h: η σταθερά του Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)

ΔS^\ddagger : η μεταβολή της εντροπίας ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

Για να μελετήσουμε τη δομική σταθερότητα των ενζύμων *GmGSTU4-4*, *sh4*, *shII5*, *shII6* και *shII7* επιλέξαμε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες, 50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε κατάλληλους χρόνους σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M και pH 6,5 χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH, § 2.2.15. Σε κάθε θερμοκρασία επώαστηκε κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος.

3.2.2.12 Επίδραση pH και θερμοκρασίας στην ταχύτητα αντίδρασης των ενζύμων

Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της αντίδρασης. Αυτό οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες και έτσι επηρεάζεται η στερεοδομή του ενζύμου. Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με το σύστημα CDNB/GSH σε θερμοκρασιακό εύρος 0 - 85 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0,1 M, pH 6,5). Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από το pH εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας με το σύστημα CDNB/GSH σε εύρος pH 5 - 5,8 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως 0,1 M και όξινου φωσφορικού δινατρίου ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M. Στο εύρος pH 6 - 8 χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού δινατρίου ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M και δισόξινου φωσφορικού νατρίου ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M.

3.2.2.13 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής GST ισοενζύμου

Ποσότητα καθαρής GST sh4 (16 mg) υποβλήθηκε σε διαδικασία κρυσταλλοποίησης για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής από την ομάδα του Δρ. Παπαγεωργίου στο Κέντρο Βιοτεχνολογίας στη Φινλανδία (Turku) με χρήση περίθλασης ακτίνων-X.

3.2.2.14 Έλεγχος πεπτιδίου (GIE) ως υπόστρωμα GST ισοενζύμων

Σε μια δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0,1 M, pH 6,5). Έπειτα, προσθέτουμε το CDNB (30 mM), το πεπτίδιο (Gly-Pe-Glu) (75 mM), ανακινούμε και τέλος την κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος.

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

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	934	934 - x(*)
CDNB	33	33
Πεπτίδιο (GIE)	33	33
Ένζυμο	-	x (*)
Συνολικός όγκος	1000	1000

(*) όπου x η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

3.2.2.15 Έλεγχος πεπτιδίου (GIE) ως δυνητικός αναστολέας GST ισοενζύμων

Προκειμένου να αξιολογηθεί το πεπτίδιο (Gly-Ile-Glu) ως δυνητικός αναστολέας των GST ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος για την ικανότητά του να δρα ως αναστολέας της δραστηριότητας του ισοενζύμου που εξετάζεται σε κάθε περίπτωση.

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0,1 M, pH 6,5). Έπειτα, προσθέτουμε το CDNB (30 mM), τη GSH (75 mM) και το πεπτίδιο (10 mM) ανακινούμε και τέλος την κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος.

3.2.2.16 Προσδιορισμός τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) πεπτιδίου

Ο προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος του πεπτιδίου Gly-Ile-Glu, δηλαδή ο υπολογισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης του αναστολέα, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή 50 % (IC_{50}), αναφέρεται αναλυτικά στην § 2.2.36.

3.2.2.17 Προσδιορισμός της αναστολής (%) των ισοενζύμων από ξενοβιοτικές ενώσεις

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των ισοενζύμων κατά την έκθεσή τους σε ξενοβιοτικές ενώσεις, εκτιμάται η δραστηριότητα του καθ' ενός με το σύστημα CDNB/GSH στους 37 °C (§ 2.2.37). Οι μετρήσεις ($\Delta A/\Delta t$) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αντίστοιχης παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (RA) και, από αυτήν, της ενζυμικής αναστολής (EI) (3.3). Η μέτρηση απουσία αναστολέα θεωρήθηκε ως 100 % RA και 0 % EI. Οι τιμές RA και EI υπολογίσθηκαν ως εξής :

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

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

(3.3)

3.2.2.18 Προσδιορισμός τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) ξενοβιοτικού

Ο προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος ξενοβιοτικού, αναφέρεται αναλυτικά στην § 2.2.36.

3.2.2.19 Θερμική δοκιμασία μετατόπισης (protein thermal shift assay)

Η θερμική δοκιμασία μετατόπισης έγινε με τη συσκευή STEP ONE StepOne™ System της Applied Biosystems®. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε εύρος θερμοκρασιών 4 °C - 99 °C με βήμα 1 % με πρώτο στάδιο 2 min στους 4 °C (100 %) σε standard πρωτόκολλο. Αναλυτικότερα, για τον άγριο τύπο, *GmGSTU4-4*, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πρωτεΐνης 2,95 μg, για το sh4 3,1 μg και για το shII5 2,56 μg, σε τελικό όγκο 12,5 μL. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (5 μL) μαζί με κατάλληλη χρωστική (2,5 μL).

3.2.2.20 Διαφορική μικροθερμιδομετρία σάρωσης (Differential scanning calorimetry)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή DSC 8500 της εταιρίας Perkin Elmer.

Η διαδικασία που ακολουθείται για να υπολογίσουμε το σημείο τήξεως της πρωτεΐνης είναι η εξής:

- Ζυγίζουμε το κάτω μέρος της κάψουλας.
- Ζυγίζουμε το καπάκι της κάψουλας.
- Τοποθετούμε το δείγμα μας και υπολογίζουμε το βάρος. Θα πρέπει το δείγμα να καλύπτει όλη την κάτω επιφάνεια της κάψουλας.
- Τοποθετούμε το καπάκι της κάψουλας και την ασφαλίζουμε με την ειδική συσκευή.
- Ζυγίζουμε το συνολικό βάρος της κάψουλας.
- Ετοιμάζουμε και μία κάψουλα αναφοράς με διάλυμα/νερό μέσα σε αυτή.
- Τοποθετούμε τις κάψουλες δείγματος και αναφοράς στο φούρνο.

Για τη μελέτη θερμικής σταθερότητας χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης της πρωτεΐνης, μετά τον καθαρισμό (0,1 M, KH_2PO_4 , pH 6,5). Ο τελικός όγκος στην κάψουλα δεν ξεπερνά τα 50 μL. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε εύρος θερμοκρασιών 20 °C - 90 °C σε ρεύμα αζώτου με ρυθμό ροής στα 20 mL/min και ρυθμό θέρμανσης 2 °C/min, έπειτα από ένα λεπτό στην αρχική θερμοκρασία. Μετά το πέρας των μετρήσεων οι τιμές οι οποίες λαμβάνονται, μεταφέρονται σε ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας, *Pyris*, στο οποίο πραγματοποιείται επεξεργασία των δεδομένων.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίζεται άμεσα με απορρόφηση του δείγματος στα 280 nm. Επειδή ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται στα δύο αμινοξέα τρυπτοφάνη και τυροσίνη (Trp, Tyr) και το ποσοστό τους διαφοροποιείται από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη, για τον ακριβή προσδιορισμό της απορρόφησης στα 280 nm, θα πρέπει να προσδιοριστεί ο *συντελεστής απόσβεσης* ϵ για κάθε καθαρή πρωτεΐνη από την αμινοξική ανάλυση. Για τον προσδιορισμό του συντελεστή μοριακής απόσβεσης για την πρωτεΐνη-δείγμα χρησιμοποιείται ο ιστότοπος: <http://web.expasy.org/protparam/> (cysteines reduced).

Έτσι γνωρίζοντας το συντελεστή μοριακής απόσβεσης μιας πρωτεΐνης, υπολογίζεται η συγκέντρωση από την απορρόφηση και το νόμο των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon lc$$

όπου l : το μήκος της διαδρομής της κυψελίδας του φωτομέτρου (1 cm).

Τα δείγματα που υπεβλήθησαν σε διαφορετική θερμοδομετρία σάρωσης είναι το *GmGSTU4-4* καθώς και το *sh4*. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε είναι 1,1075 mg για το *GmGSTU4-4* και 1,335 mg για το *sh4*.

3.2.2.21 Μελέτη της δομικής αποδιάταξης πρωτεΐνης παρουσία ουρίας

Μελετήθηκε η αποδιάταξη της πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ως αποδιατακτικό παράγοντα την ουρία. Η αποδιάταξη αυτή οφείλεται στην εκπομπή και στην απορρόφηση ενέργειας που προκαλείται στα αμινοξέα, τυροσίνη και τρυπτοφάνη, μετά τη διέγερσή τους. Σύμφωνα με τον Wallace όταν η διέγερση πραγματοποιείται στα 280 nm παρατηρείται το φάσμα που οφείλεται στη διέγερση της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης ενώ στα 295 nm το φάσμα που οφείλεται μόνο στη διέγερση της τρυπτοφάνης (Wallace *et al.*, 1998). Η εκπομπή και στις δύο περιπτώσεις ρυθμίζεται στα 320 nm. Οι μετρήσεις έγιναν σε εύρος 280-400 nm.

Τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5* υπεβλήθησαν σε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5. Μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τους με τη μέθοδο Bradford (§ 2.2.14) και έπειτα ακολούθησε συμπύκνωση

σε τελικό όγκο περίπου 500-600 μL . Τέλος, επαναπροσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Μελετήθηκε η θερμική μετουσίωση των ισοενζύμων συναρτήσει του χρόνου, με τη μέθοδο του φθορισμού. Σε κυψελίδα των 4 mL, κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος (2,5 μM για το *GmGSTU4-4*, 3 μM για το *sh4* και 3,2 μM για το *shII5*) επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Σε χρόνο $t=0$ συλλέγεται το φάσμα του ενζύμου. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 5 min μέχρις ότου παρατηρηθεί μετατόπιση στο φάσμα του ενζύμου. Η μετατόπιση ταυτίζεται με την έναρξη της θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου. Για τη συλλογή φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το Fluorescence Spectrometer LS 45 της Perkin Elmer.

Έπειτα, προετοιμάστηκε διάλυμα ουρίας, όπως αυτό περιγράφεται στην παράγραφο § 2.1.2.6 καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 6,5 το οποίο έχει παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 48 h ώστε να έρθει σε ισορροπία. Μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας στην ενζυμική δραστηριότητα. Σε κυψελίδα του 1 mL προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,1 M KH_2PO_4), κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος και συγκεκριμένη συγκέντρωση ουρίας, από 0,25-10 M. Ακολούθησε επώαση για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιείται μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης. Ο υπολογισμός της παραμένουσας δραστηριότητας γίνεται με το σύστημα CDNB/GSH. Ως 100 % θεωρούμε τη μέτρηση απουσία ουρίας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τέλος, μελετήθηκε η μετατόπιση του φάσματος των ισοενζύμων παρουσία ουρίας. Σε κυψελίδα των 4 mL προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,1M KH_2PO_4 , pH 6,5), κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος και συγκεκριμένη συγκέντρωση ουρίας, από 0,25-10 M. Έπειτα από κατάλληλη επώαση συλλέγεται το επιθυμητό φάσμα. Από την ένταση του φθορισμού κάθε φορά υπολογίζεται το τμήμα της πρωτεΐνης που εξακολουθεί να είναι αναδιπλωμένο (f_F), το τμήμα αυτής που έχει ήδη ξεδιπλωθεί (f_U), τη σταθερά ισορροπίας K καθώς και την ενέργεια ενεργοποίησης ΔG (εξισώσεις 3.4, 3.5, 3.6).

$$f_u = (y_F - y) / (y_F - y_u) \quad (3.4)$$

$$K = f_U / f_F$$

(3.5)

$$\Delta G = - R T \ln K$$

(3.6)

Όπου

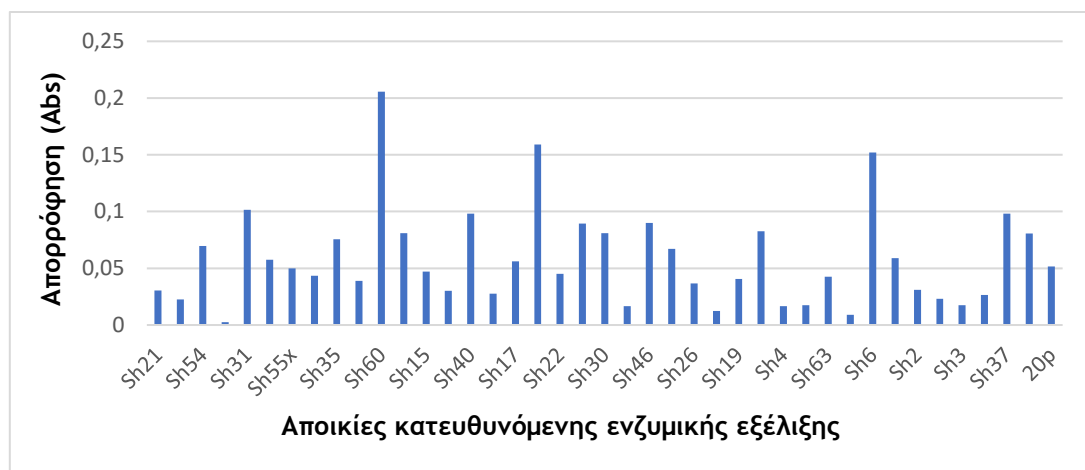
$$f_F + f_U = 1$$

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C). Για τη συλλογή φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το Fluorescence Spectrometer LS 45 της Perkin Elmer.

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Σάρωση βιβλιοθήκης πρώτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

Πραγματοποιήθηκε σάρωση της βιβλιοθήκης που δημιουργήθηκε μέσω της διαδικασίας της ενζυμικής κατευθυνόμενης εξέλιξης (Axarli *et al.*, 2016). Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *GmGSTU2-2*, *GmGSTU4-4* και *GmGSTU10-10* που αποτέλεσαν και την πατρική γενεά (Axarli *et al.*, 2016). Τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν πάνω από 88 % ομολογία μεταξύ τους. Τα χμαιρικά ένζυμα που προέκυψαν αποτελούνται τόσο από εναλλαγές κομματιών των πατρικών γονιδίων όσο και από σημειακές μεταλλάξεις. Στις μεταλλαγμένες μορφές που προέκυψαν έγινε προσδιορισμός της δραστηριότητας με το σύστημα GSH/alachlor (Εικόνα 3.1). Η φωτομετρική αυτή μέθοδος προσδιορισμού στηρίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αλογόνου να αντικαθιστούν τα θειοκυανικά από τα σύμπλοκά τους με τα ιόντα υδραργύρου, προς το σχηματισμό ενός πορτοκαλί συμπλόκου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, alachlor και ενζύμου. Η ποσότητα της GSH που δεν έχει συμπλοκοποιηθεί με το υπόστρωμα αδρανοποιείται προσθέτοντας μαλεϊμίδιο στην αντίδραση.



Εικόνα 3.1: Ιστόγραμμα που παρουσιάζει τη σάρωση της βιβλιοθήκης του πρώτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης με το σύστημα GSH/alachlor.

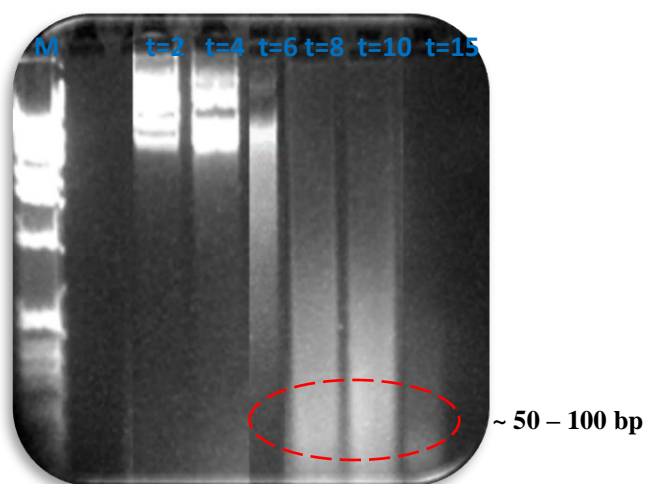


Εικόνα 3.2: Ιστόγραμμα που παρουσιάζει την ενζυμική δραστηκότητα με το σύστημα GSH/CDNB σε δείγματα που προέρχονται από τη βιβλιοθήκη πρώτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης.

Οι αποικίες που εμφάνισαν υψηλή δραστηκότητα στη δοκιμασία GSH-alachlor (§ 3.3.2.1) καθώς και ικανοποιητική ενζυμική δραστηκότητα με το σύστημα CDNB/GSH (§ 2.2.15) (Εικόνα 3.2) επιλέχθηκαν ως οι καλύτερες για να αποτελέσουν τη μήτρα της δεύτερης κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Ειδικότερα, αυτές είναι οι Se 7, Se 12, Se 22, Se 23, Se 26, Se 32, Se 34.

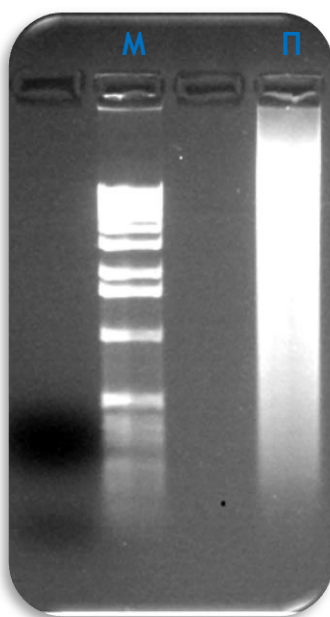
3.3.2 Δεύτερος κύκλος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης GST ισοενζύμων

Αρχικά οι αποικίες που επιλέχθηκαν υπεβλήθησαν σε πέψη σε μικρά κομμάτια, 50-100 bp, έπειτα από κατεργασία με DNase. Πιο συγκεκριμένα, αναμίχθηκε πλασμιδιακό DNA από επτά αποικίες (Se 7, Se 12, Se 22, Se 23, Se26, Se32, Se34), με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης TE. Έπειτα, προστίθεται DNase και ακολουθεί επώαση. Σε κατάλληλους χρόνους πραγματοποιείται παύση της αντίδρασης και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2 % (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Πέψη του πλασμιδιακού DNA με DNase. Στους χρόνους t=2, 4, 6, 8, 10 και 15 min η αντίδραση διακόπτεται και αναλύεται με ηλεκτροφόρηση. M: μάρτυρας 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Ακολουθεί, τυχαία επανασύνδεση των τμημάτων του πλασμιδιακού DNA, με μοριακό βάρος 50-100 bp, με PCR χωρίς τη χρήση εκκινητών (Εικόνα 3.4). Οι χρόνοι οι οποίοι φαίνεται να δούλεψαν καλύτερα είναι οι t=8, t=10 και t=12 min. Το αποτέλεσμα της PCR φαίνεται στην Εικόνα.

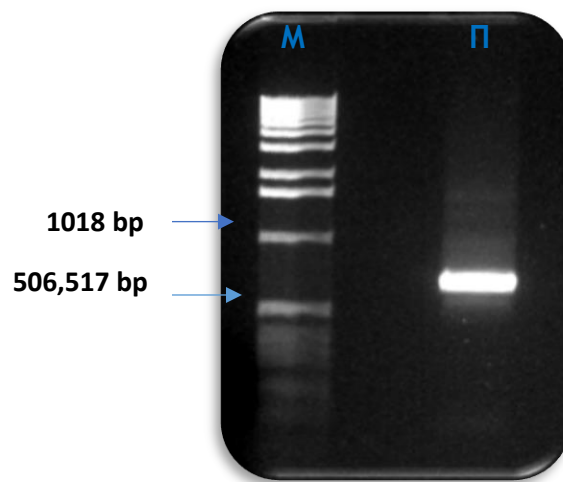


Εικόνα 3.4: Αντίδραση PCR χωρίς την εισαγωγή εκκινητών. M: μάρτυρας 100 bp DNA Ladder (Biolabs). Π: Προϊόν αντίδρασης PCR χωρίς εκκινητές.

Τέλος, ακολουθεί PCR με εκκινητές, εκλεκτικούς για το γονίδιο *GmGSTU4-4* (Εικόνα 3.5), ώστε να ενισχυθούν πλήρους μήκους γονίδια. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pETite C-His (Εικόνα 2.3) και ακολούθησε μετασχηματισμός

των δεκτικών κυττάρων HI-Control BL21 (DE3) παρουσία αντιβιοτικού (καναμυκίνη-30 mg/mL), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην § 2.2.24.

Αναλυτικότερα, η αντίδραση ένωσης του προϊόντος PCR με τον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα στάδια που περιγράφονται στη συνέχεια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύνθεση εκκινητών που φέρουν κολλώδη άκρα. Ακολούθησε, PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου. Πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στον pETite C-His vector και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων. Τέλος, οι νέες GSTs με τις επιθυμητές ιδιότητες επιλέγονται κατόπιν σάρωσης με βάση τη δραστηριότητα.



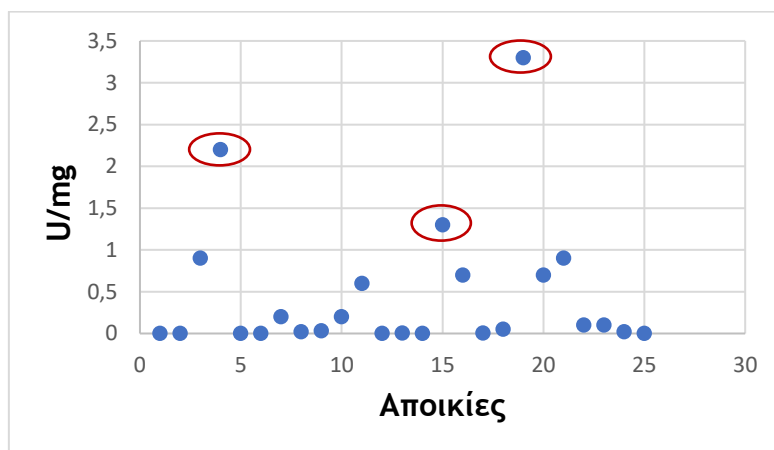
Εικόνα 3.5: PCR με χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο *GmGSTU4-4*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

3.3.3 Σάρωση βιβλιοθήκης δεύτερου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

Πραγματοποιήθηκε σάρωση 25 αποικιών και προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα με το σύστημα GSH/CDNB. Μόνο δέκα από τις είκοσι πέντε αποικίες εμφάνισαν δραστηριότητα με το σύστημα GSH/CDNB ενώ οι υπόλοιπες μηδενική ή σχεδόν μηδενική (Σχήμα 3.2). Οι αποικίες που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν περαιτέρω είναι οι sh4, sh15 και sh19 που εμφάνισαν μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA και υποβλήθηκε σε αλληλούχιση. Αναζήτηση της ομολογίας με το πρόγραμμα Blastp έδειξε ότι οι μορφές εμφάνισαν υψηλή ομολογία, όπως ήταν αναμενόμενο, με το ένζυμο *GmGSTU4-4* ([NP_001237713.2](#)). Ειδικότερα, η αποικία sh4 παρουσιάζει 96 %

ομολογία με τον άγριο τύπο, η αποικία sh15 98 % ομοιότητα και η αποικία sh19 97 % ομοιότητα (Εικόνα 3.6).

Στο παρακάτω Σχήμα παρουσιάζεται η διασπορά της ενζυμικής δραστηριότητας των αποικιών μετά το δεύτερο κύκλο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης (Σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση της ενζυμικής δραστηριότητας των αποικιών μετά το δεύτερο κύκλο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Επισημαίνονται οι αποικίες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

```

sh19      MSDEVLLDFWSPFGRVRIALAEKGIKYESKEEDLQNKSPLLLKMNPVHKKIPVLIHN
sh4       MSDEVLLDFWSPFGRVRIALAEKGI EYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPNVHKKIPVLIHN
GmGSTU4-4 MSDEVLLDFWSPFGRVRIALAEKGIKYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPNVHKKIPVLIHN
sh15     MSDEVLLDFWSPFGRVRIALAEKGI EYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPNVHKKIPVLIHN
*****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

sh19      GKPICESLIIVQYIEEVWNRNPLLPSPYQRAQARFWADFVDNKIHDLGRKIWTSKGEE
sh4       GKPICESLIIVQYIEEVWNRNPLLPSPYQRAQARFWADFVDNKIHDLGRKIWTSKGEE
GmGSTU4-4 GKPICESLIIVQYIEEVWNRNPLLPSPYQRAQTRFWADYVDKKIYDLGRKIWTSKGEE
sh15     GKPICESLIIVQYIEEVWNRNPLLPSPYQRAQTRFWADYVDKKIYDLGRKIWTSKGEE
*****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

sh19      KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGDNLGFVDIALVPFYTWFKAYETFGLNIESECP
sh4       KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGDNLGFVDIALVPFYTWFKAYETFGLNIESECP
GmGSTU4-4 KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGDNLGFVDIALVPFYTWFKAYETFGLNIESECP
sh15     KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGDNLGFVDIALVPFYTWFKAYETFGLNIESECP
*****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

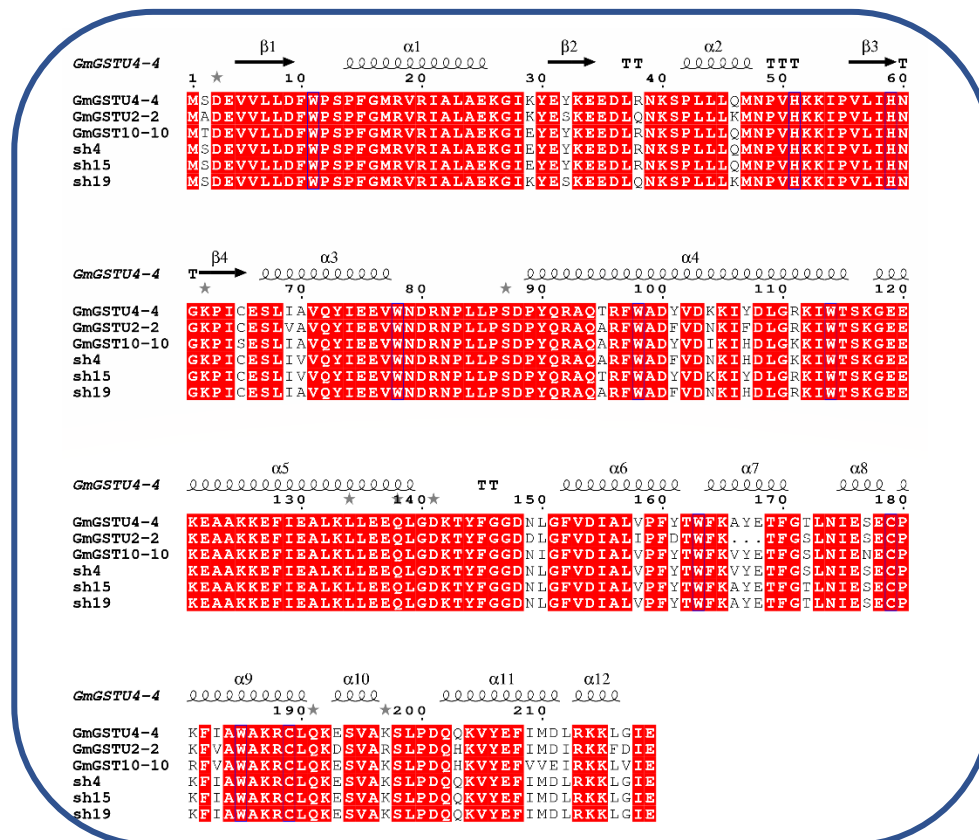
sh19      KFIAWAKRCLQKESVAKSLPDQQKVYEFIMDLRKKLGIE
sh4       KFIAWAKRCLQKESVAKSLPDQQKVYEFIMDLRKKLGIE
GmGSTU4-4 KFIAWAKRCLQKESVAKSLPDQQKVYEFIMDLRKKLGIE
sh15     KFIAWAKRCLQKESVAKSLPDQQKVYEFIMDLRKKLGIE
*****: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

Εικόνα 3.6: Πολλαπλή Στοιχισή αλληλουχιών μέσω του προγράμματος ClustalW των ισοενζύμων sh4, sh15, sh19 καθώς και του άγριου τύπου *GmGSTU4-4* (Clustal W, Thompson *et al.*, 1994).

Όπως παρατηρούμε από την παραπάνω πολλαπλή στοιχισή το sh4 διαφέρει από το *GmGSTU4-4* κατά εννιά αμινοξέα, το sh15 διαφέρει μόλις κατά δύο ενώ το sh19 κατά επτά αμινοξέα (Εικόνα 3.6). Πολλαπλή στοιχισή πραγματοποιήθηκε και ανάμεσα στις

πατρικές αλληλουχίες του πρώτου κύκλου της κατευθυνόμενης εξέλιξης, *GmGSTU4-4*, *GmGSTU2-2*, *GmGSTU10-10*, με τα ισοένζυμα που προέκυψαν από το δεύτερο κύκλο (Εικόνα 3.7). Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ισοενζύμων. Επίσης, στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο των ισοενζύμων καθώς και το θεωρητικό μοριακό τους βάρος (Πίνακας 3.1).



Εικόνα 3.7: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών, μέσω του προγράμματος ClustalW, των ισοενζύμων *GmGSTU4-4*, *GmGSTU2-2*, *GmGSTU10-10*, *sh4*, *sh15* και *sh19* (Clustal W, Thompson *et al.*, 1994).

Πίνακας 3.1: Θεωρητικός υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου και μοριακού βάρους με τη χρήση του EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/)

Ένζυμο	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
<i>GmGSTU4-4</i>	6,23	25.604,66
<i>sh4</i>	5,58	25.533,54
<i>sh15</i>	5,64	25.633,66
<i>sh19</i>	6,03	25.414,42

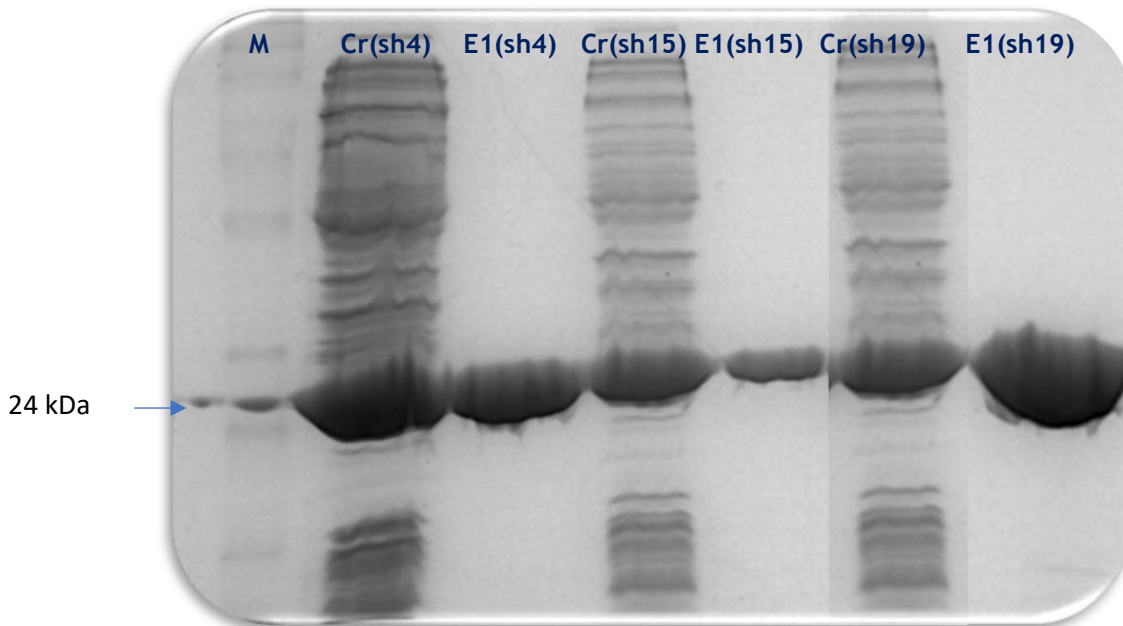
3.3.4 Έκφραση και καθαρισμός GST ισοενζύμων

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των ισοενζύμων sh4, sh15 και sh19 που προέκυψαν από την κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη. Ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* HI Control BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (§ 2.2.3). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C με θρεπτικό μέσο λακτόζης για 24 h, έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη (30 mg/mL). Μετά το πέρας 24 h κατάλληλη ποσότητα κυττάρων λύεται με τη βοήθεια υπερήχων και το βιολογικό εκχύλισμα που προκύπτει, μετά τη φυγοκέντρηση, φορτώνεται σε κλώνα χρωματογραφίας συγγένειας (§ 2.2.13).

Τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, sh4, sh15 και sh19, καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 54 %, 76,3 %, 56 % και 68,3 %, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2). Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, για να εκλεχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η καθαρότητα τους (Εικόνα 3.8).

Πίνακας 3.2: Απόδοση καθαρισμού (%) της χρωματογραφίας συγγένειας.

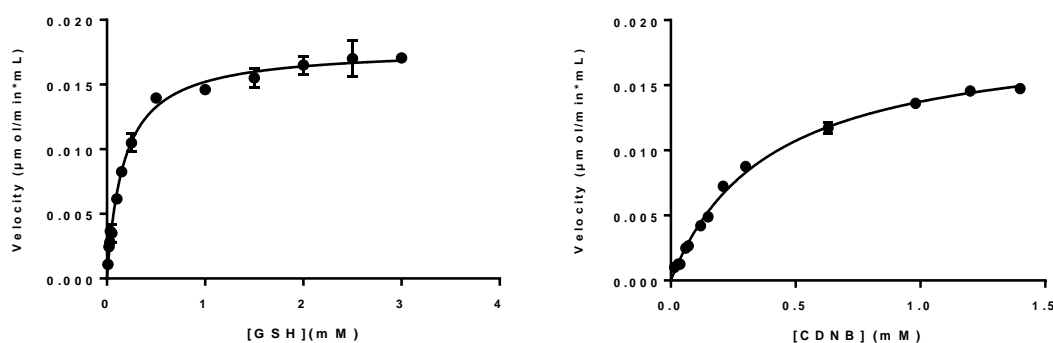
Ένζυμο	Απόδοση καθαρισμού (%)
<i>GmGSTU4-4</i>	54
sh4	76,3
sh15	56
sh19	68,3



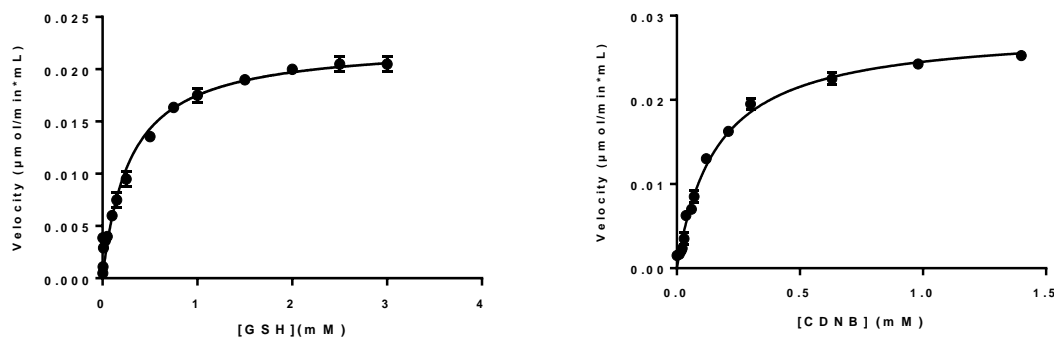
Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % w/v) παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), Cr(sh4): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) του sh4, E1(sh4): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το sh4, Cr(sh15): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) του sh15, E1(sh15): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το sh15, Cr(sh19): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) του sh19, E1(sh19): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το sh19.

3.3.5 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών για το σύστημα GSH/CDNB

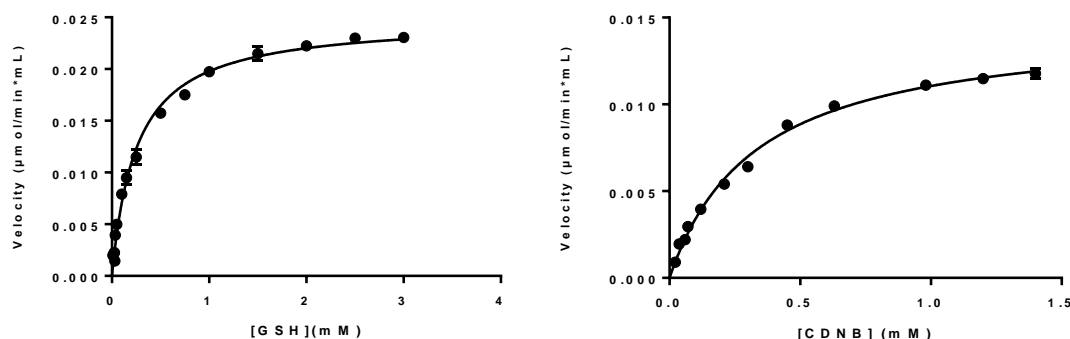
Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για τα υποστρώματα GSH και CDNB (Εικόνα 3.9, 3.10, 3.11). Όπως φαίνεται από τις παραστάσεις τα ισοένζυμα ακολουθούν κινητική *Michaelis Menten*.



Εικόνα 3.9: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο sh4.



Εικόνα 3.10: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο sh15.



Εικόνα 3.11: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο sh19.

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας με τις σταθερές K_m και k_{cat} για τα για τα τρία ισοένζυμα (sh4, sh15, sh19) (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Κινητικές σταθερές για τα ισοένζυμα sh4, sh15 και sh19 για το σύστημα CDNB/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	sh4		sh15		sh19	
	CDNB	GSH	CDNB	GSH	CDNB	GSH
K_m (mM)	$0,4 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,01$
k_{cat} (min^{-1})	$35,6 \pm 8,5$		$136,6 \pm 21$		$130 \pm 23,2$	

3.3.6 Μελέτη εκλεκτικότητας ισοενζύμων

Στα ισοένζυμα που προέκυψαν από τη διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης, όπως και για τον άγριο τύπο, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα έναντι ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων για να διαπιστωθεί εάν εμφανίζουν και άλλες δράσεις όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή δράση αναγωγής και θειολοτρανσφοράσης.

Τα ισοένζυμα φαίνεται να εμφανίζουν ευρεία εκλεκτικότητα. Ειδικότερα, τα sh4 και sh15 καταλύουν δεκατρία υποστρώματα σε σύνολο δεκαοχτώ ενώ το sh19 παρουσιάζει διευρυμένη εκλεκτικότητα καθώς καταλύει δεκαπέντε από τα δεκαοχτώ υποστρώματα.

Αναλυτικότερα, το *GmGSTU4-4* καταλύει οκτώ υποστρώματα σε σύνολο δεκαοκτώ. Από τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του, 1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα εκτός από το pNBC (Πίνακας 3.4). Επίσης, εμφανίζει αξιοσημείωτη ειδική δραστηριότητα έναντι των FDNB (περίπου 2-φορές υψηλότερη) και BDNB (περίπου 2,5-φορές υψηλότερη) σε σχέση με τα υπόλοιπα παράγωγα του νιτροβενζολίου. Τέλος, το *GmGSTU4-4* παρουσιάζει μικρή καταλυτική δράση έναντι του fluorodifen και του αιθακρινικού οξέος και φαίνεται να καταλύει την αντίδραση προσθήκης τηςθειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ισοθειοκυανικού φαινυλαιθυλεστέρα (Πίνακας 3.4).

Τα ισοένζυμα, sh4, sh15 και sh19, παρουσιάζουν σχεδόν παρόμοια συμπεριφορά. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.4 παρακάτω, τα ισοένζυμα εμφανίζουν καταλυτική δράση με όλα τα παράγωγα του νιτροβενζολίου. Πιο συγκεκριμένα, και τα τρία ισοένζυμα εμφάνισαν ιδιαιτέρως υψηλή ειδική δραστηριότητα με το FDNB, αρκετά υψηλότερη σε σχέση με το CDBN, που αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα για τις GSTs. Πιο συγκεκριμένα, το sh4 και το sh15 εμφάνισαν σχεδόν τριπλάσια ειδική δραστηριότητα ενώ το sh19 πάνω από 11-φορές μεγαλύτερη δράση. Επίσης, και τα τρία ισοένζυμα εξετάστηκαν ως προς τη δράση υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, τ-βουτυλουδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου, ως πιθανά υποστρώματα. Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα και για τα τρία ισοένζυμα, αν και εμφάνισαν αρκετά χαμηλή ειδική δραστηριότητα (Πίνακας 3.4). Είναι γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας οξειδωτικής καταπόνησης, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξειδία, μετατρέποντάς τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Labrou *et al.*, 2015). Επιπλέον, και τα τρία ισοένζυμα εμφανίζουν σχετικά υψηλή ειδική δραστηριότητα με το διφαινυλικό αιθέρα, το fluorodifen. Μόνο το ισοένζυμο sh15 φαίνεται να έχει καταλυτική δράση με το αιθακρινικό οξύ ενώ τα sh4 και sh19 εμφανίζουν ειδική

δραστικότητα με την trans-2-ενενάλη. Το ισοένζυμο sh4 βρέθηκε να έχει χαμηλή ειδική δραστικότητα έχοντας ως υπόστρωμα τη 2-2διθειοδιαιθανόλη όπως και τα sh15, sh19 το διϋδροασκορβικό οξύ. Τέλος, οι ισοθειοκυανικοί εστέρες φαίνεται να αποτέλεσαν υπόστρωμα μόνο για το ισοένζυμο sh19 ενώ η βρωμοσουλφοφθαλεΐνη δεν αποτελεί υπόστρωμα για κανένα από τα παραπάνω ισοένζυμα.

Στον παρακάτω Πίνακα εμφανίζεται η *ειδική δραστικότητα (%)* την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, sh4, sh15 και sh19 έναντι των διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4: Ειδική δραστικότητα (%) των ισοενζύμων, *GmGSTU4-4*, sh4, sh15 και sh19, ως προς διαφορετικά ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστικότητα που εμφάνισαν τα ισοένζυμα έναντι του CDNB.

Υπόστρωμα	<i>GmGSTU4-4</i>	sh4	sh15	sh19
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο	100	100	100	100
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο	191,7	151,8	108,6	127,2
1-φθορο-2,4δινιτροβενζόλιο	68,4	302,7	71,6	1081,8
1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο	2,5	21,3	14,8	36,4
π-νιτροβενζυλχλωρίδιο	0	0,9	0,3	0,009
4-χλωρο-7 νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο	16,8	51,8	100	72,7
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου	0	0,01	0,2	0,003
τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο	0	0,04	0,01	0,004
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	0	0,01	0,1	0,002
διϋδροασκορβικό οξύ	0	0	1,2	0,004
trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη	0	10,2	1,2	36,6

Fluorodifen	77,7	14,8	12,3	127,3
Εθακρινικό οξύ	16,4	0	6,1	0
ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας	0	0	0	9,1
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας	2,8	0	0	9,1
2-2διθειοδιαιθανόλη	0	0,1	0	0
trans-2-ενενάλη	0	1,8	0	2,7
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη	0	0	0	0

3.3.7 Βιοϋπολογιστική και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μορφών sh15 και sh19

Πραγματοποιήθηκε βιοϋπολογιστική μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών και ειδικότερα των χμαιοτικών μορφών sh15 και sh19. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα πρόγραμμα PyMOL και Swiss Model. Η πρόβλεψη της δομής έγινε με εφαρμογή ομόλογης μοντελοποίησης (homology modeling). Τα αποτελέσματα έδειξαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά αναφορικά με τις σχέσεις δομής και βιολογικής δράσης:

Κάθε υπομονάδα έχει χαρακτηριστική παρόμοια αναδίπλωση (GST fold), δηλαδή αποτελείται από 7 α-έλικες και 4 β-ελάσματα και διαχωρίζεται σε δύο δομικές ενότητες, τη N- και τη C-τελική δομική περιοχή. Η N-τελική δομική ενότητα αποτελείται από β-ελάσματα και α-έλικες ενώ η C-τελική δομική ενότητα αποτελείται μόνο από α-έλικες. Σε κάθε υπομονάδα του διμερούς υπάρχουν δυο ανεξάρτητες περιοχές δέσμευσης υποστρώματος: μια εξειδικευμένη περιοχή που δεσμεύει τη GSH (G-θέση) και βρίσκεται στη N-τελική δομική περιοχή και μια μη-εξειδικευμένη όπου εκεί δεσμεύονται τα υδρόφοβα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (H-θέση), στη C-τελική δομική ενότητα.

Η N-τελική δομική περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη, αποτελεί περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης και παρέχει τη θέση δέσμευσης της GSH. Η τριτοταγής δομή της N-τελικής δομικής ενότητας υιοθετεί μια χαρακτηριστική *GST αναδίπλωση* ίδια με αυτήν της θειορεδοξίνης η οποία θεωρείται πρόγονος των GSTs. Η αναδίπλωση αυτή, αποτελείται από δύο ευδιάκριτα δομικά μοτίβα, το N-τελικό β1α1β2 και το C-τελικό β3β4α3 τα οποία συνδέονται με ένα μεγάλο βρόγχο που περιέχει μια α-έλικα (α2).

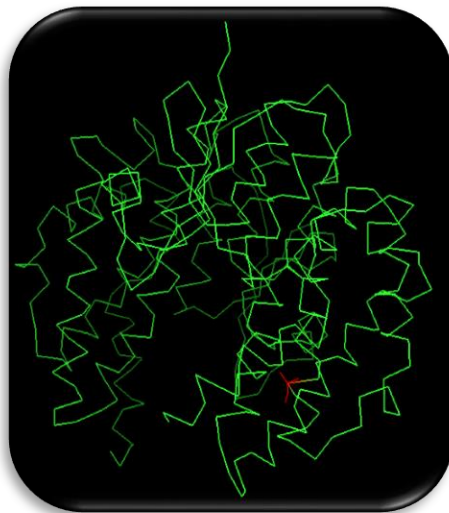
Η C-τελική δομική ενότητα αποτελείται από επτά α-έλικες και ενώνεται με τη N-τελική δομική ενότητα μέσω ενός συνδέσμου μικρού αριθμού αμινοξικών καταλοίπων (δέκα). Ο αριθμός των α-ελίκων ποικίλει ανάμεσα στις διαφορετικές κλάσεις. Η δομική αυτή περιοχή παρέχει τα δομικά στοιχεία για την αναγνώριση των ξενοβιοτικών υποστρωμάτων (H-θέση).

Η G-θέση είναι υψηλά συντηρημένη σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας στις μορφές sh15 και sh19 και όπως αναφέρθηκε βρίσκεται στη N-τελική δομική περιοχή. Πολλαπλοί πολικοί δεσμοί συνεισφέρουν στην πρόσδεση του φορτισμένου τριπεπτιδίου του GSH. Στη θέση αυτή βρίσκεται και το συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο που αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα του GSH για να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS^-). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PyMOL και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.12-3.14.

Μετά από την πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Εικόνα 3.7), μέσω του προγράμματος ClustalW, παρατηρήθηκε ότι τα δύο ισόένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους κατά μερικά μόνο αμινοξικά κατάλοιπα. Συγκεκριμένα, η διαφορά τους έγκειται σε εννιά σημειακές μεταλλάξεις που εκτείνονται καθ' όλο το μήκος της αλληλουχίας τους. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι ακόλουθες: το sh19 στη θέση 29 έχει K ενώ το sh15 E, το sh19 στη θέση 32 έχει S ενώ το sh15 Y, το sh19 στη θέση 38 έχει Q ενώ το sh15 Y, το sh19 στη θέση 46 έχει K ενώ το sh15 Q. Επίσης, στη θέση 70 το sh19 έχει A ενώ το sh15 V, στη θέση 94 το sh19 έχει A ενώ το sh15 T, στη θέση 100 το sh19 έχει F ενώ το sh15 έχει Y, στη θέση 102 το sh19 έχει N και το sh15 K, στη θέση 106 το sh19 H ενώ το sh15 Y. Τα αμινοξέα που σημαίνονται στις παρακάτω εικόνες είναι μερικά από αυτά που διαφέρουν μεταξύ τους τα παραπάνω ισόένζυμα (Εικόνα 3.12-3.14).



Εικόνα 3.12: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του του ενζύμου sh15. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως μπλε περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως κόκκινα βέλη και οι βρόγχοι ως μωβ σωλήνες. Με πράσινο παρουσιάζεται το αμινοξύ τυροσίνη (Tyr-Y) στη θέση 106. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).



Εικόνα 3.13: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του του ενζύμου sh19. Με κόκκινο παρουσιάζεται το αμινοξύ αλανίνη (Ala-A) που βρίσκεται στη θέση 70. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).



Εικόνα 3.14: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου sh19. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως κόκκινες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως κίτρινα βέλη και οι βρόγχοι ως πράσινοι σωλήνες. Με μπλε παρουσιάζεται το αμινοξύ λυσίνη (Lys-K) στη θέση 29. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

3.3.8 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου sh4 με τη γλουταθειόνη

Η αμινοξική ακολουθία του sh14 φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 3.3.

```
MSDEVVLLDFWSPFGMRVRIALAEKGIEYKEYEEDLRNKSPLLLQMNPVHKKIPVLIHNGKPI
CESLIVVQYIEEVWNDRNPLLPSPDPYQRAQARFWADFVDNKIHDLGKKIWTSTKGEKEAACK
EFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDNLGFVDIALVPFYTWFKVYETFGSLNIESECPKFIAWAKRCL
QKESVAKSLPDQQKVYEFIMDLRKKLGIE
```

Σχήμα 3.3: Αμινοξική ακολουθία του ενζύμου sh4.

Ανάλυση της αλληλουχίας του ενζύμου sh4 και σύγκρισή της με τις πατρικές αλληλουχίες έδειξε υψηλό βαθμό ομολογίας (Σχήμα 3.4).

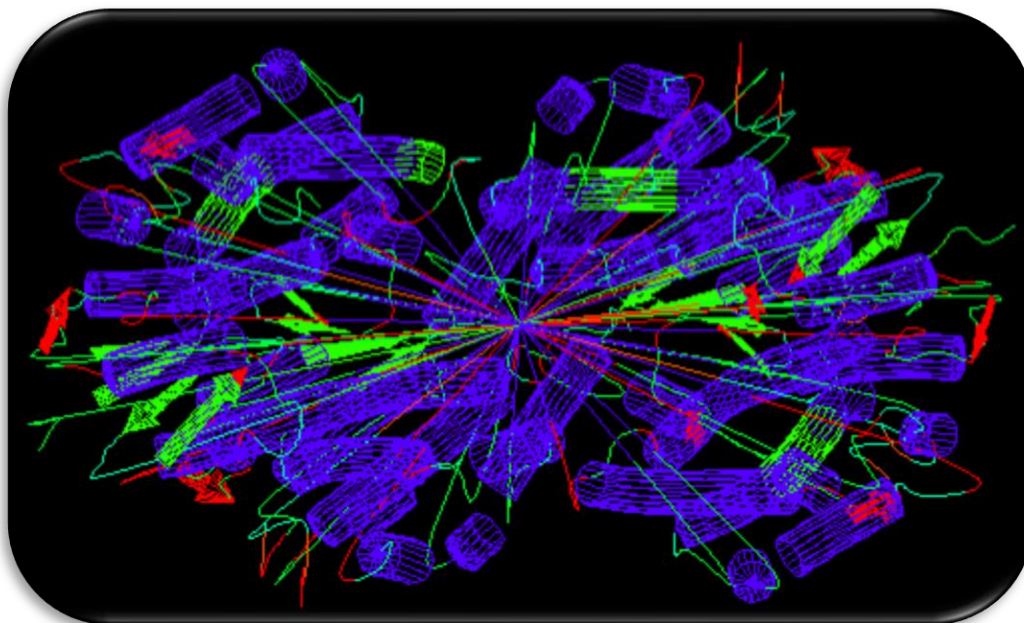

```

GmGSTU2-2      MADEVVLDFWPSFPGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLQNKSPDLLKMNPHKKIPVLIHN
GmGSTU10-10    MTDEVVLDFWPSFPGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLRNKSPLLLQMNPHKKIPVLIHN
GmGSTU4-4      MSDEVVLDFWPSFPGMRVRIALAEKGIKYESKEEDLRNKSPLLLQMNPHKKIPVLIHN
Sh4            *:*:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****
GmGSTU2-2      GKPICESLIVVQYIEEVWDRNPLLPSPDYQRAQARFWADFDVNDKIFDLGRKIWTSKGEE
GmGSTU10-10    GKPISESLIIVQYIEEVWDRNPLLPSPDYQRAQARFWADYVDIKIHDLGKKIWTSKGEE
GmGSTU4-4      GKPICESLIVVQYIEEVWDRNPLLPSPDYQRAQARFWADFDVNDKIHDLGKKIWTSKGEE
Sh4            ****.***:.*****:*****:***.***.***.***.***.***.***.***
GmGSTU2-2      KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDDLGFVDIALIPFDTWFK--TFGSLNIESECP
GmGSTU10-10    KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDNIGFVDIALVPFYTWFVKVYETFGSLNIESECP
GmGSTU4-4      KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDNLGFVDIALVPFYTWFKAYETFGTLNIESECP
Sh4            KEAAKKEFIEALKLLEEQLGDKTYFGGDNLGFVDIALVPFYTWFVKVYETFGSLNIESECP
*****:***:*****:*** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *
GmGSTU2-2      KFWAWAKRCLQKDSVARSPLDQHKVYEFIMDIRKKFDIE
GmGSTU10-10    RFVAWAKRCLQKESVAKSLPDQHKVYEFVVEIRKKLVIE
GmGSTU4-4      KFIWAKRCLQKESVAKSLPDQKQVYEFIMDLRKKLGIE
Sh4            KFIWAKRCLQKESVAKSLPDQKQVYEFIMDLRKKLGIE
*:*****:***:*****:*****:***:***:***

```

Σχήμα 3.4: Ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των πατρικών γονιδίων από τις οποίες προήλθε το sh4 καθώς και του ίδιου του sh4 μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Clustal W (Clustal W, Thompson *et al.*, 1994).

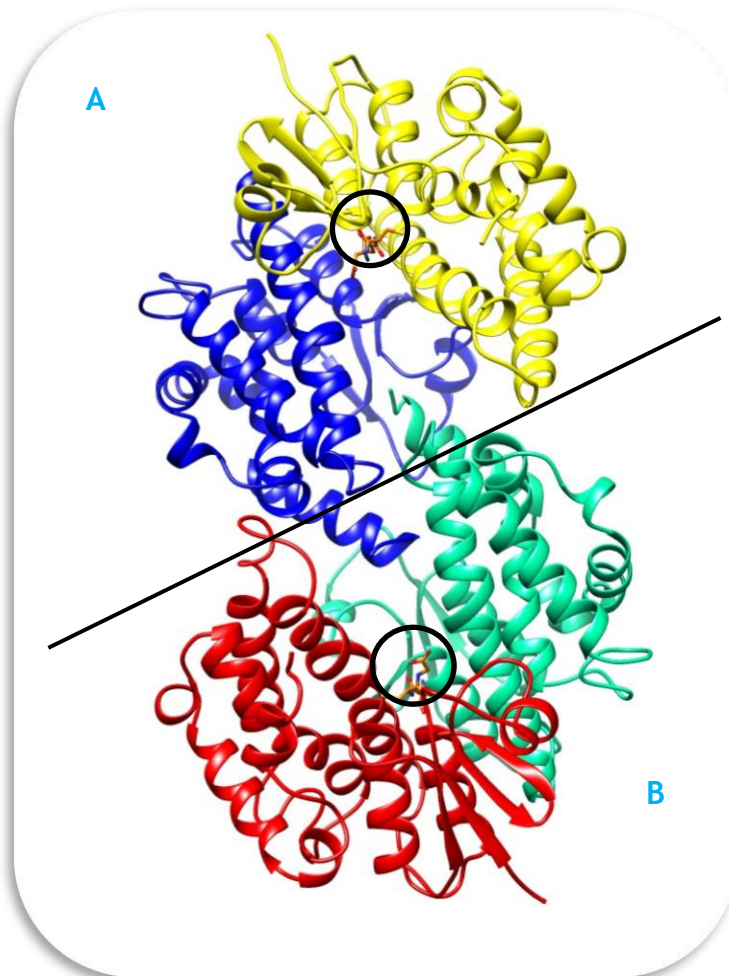
Για να κατανοηθεί πληρέστερα η λειτουργία του μεταλλαγμένου ενζύμου πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ χρησιμοποιώντας τη μοριακή αντικατάσταση καθώς και τη δομή της *Glycine max* (*GmGSTU4-4*) ως μοντέλο αναζήτησης (PDB code: 2vo4) (Axarli *et al.*, 2009). Ο προσδιορισμός της δομής του καθαρού ενζύμου sh4 με τη GSH έγινε μέσω κρυσταλλογραφίας περιθλάσης ακτίνων-Χ. Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε από το Κέντρο Βιοτεχνολογίας του Τούρκου στη Φινλανδία από την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εξάτμισης της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop vapor diffusion method) και η δομή προσδιορίστηκε με ανάλυση σε 2,27 Å (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15: Παρουσίαση της δομής του sh4. Με μπλε κυλίνδρους αναπαρίστανται οι α-έλικες, με κόκκινα βέλη τα β-ελάσματα και με πράσινα βέλη οι βρόγχοι και οι τυχαίες περιελίξεις. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

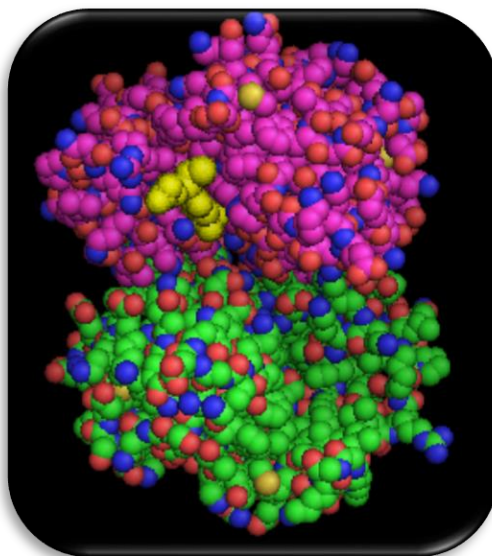
3.3.8.1 Γενικά χαρακτηριστικά της δομής

Η πρωτεΐνη sh4 κρυσταλλώνεται ως τετραμερές. Σε κάθε διμερές, η υπομονάδα περιέχει ένα μόριο GSH δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του sh4. Κάθε υπομονάδα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Διακρίνονται τα δύο διμερή, A και B. Η GSH αναπαρίσταται με ράβδους σύμφωνα με τον ατομικό του τύπο. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του μονομερούς η πρωτεΐνη αποτελείται από 219 αμινοξέα. Οι δύο υπομονάδες του sh4 σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 3.17). Ένα εμφανές χαρακτηριστικό του διμερούς είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό του μορίου, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η μεγάλη οπή που επιτρέπει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στα ενεργά κέντρα του ενζύμου.



Εικόνα 3.17: Παρουσίαση του σφαιρικού σχήματος του sh4. Κάθε υπομονάδα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η GSH αναπαρίσταται με κίτρινο χρώμα και βλέπουμε τη θέση δέσμευσής της στην υπομονάδα. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Το διμερές A αποτελείται από δύο ανεξάρτητες υπομονάδες που παρουσιάζουν μικρές διαφορές στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής τους καθώς και της τριτοταγούς. Η υπομονάδα C αποτελείται από δύο δομικές περιοχές: τη N-τελική με μοτίβο α/β (ααββα) (κατάλοιπα 1 έως 76) και τη C-τελική δομική περιοχή με μοτίβο τύπου α (κατάλοιπα 88-209). Η υπομονάδα A αποτελείται από δύο δομικές περιοχές: τη N-τελική δομική με μοτίβο α/β (βαβαββα) (κατάλοιπα 1 έως 77) και τη C-τελική δομική περιοχή με μοτίβο τύπου α (κατάλοιπα 88-209) (Εικόνα 3.16).

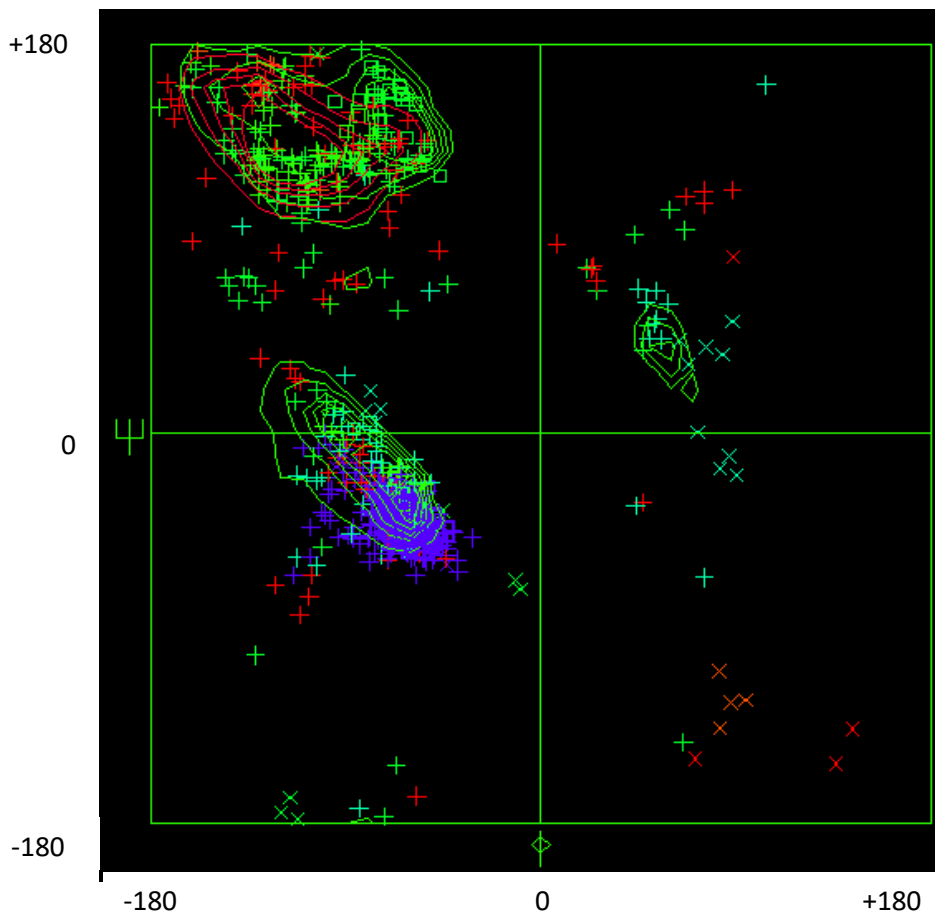
Το διμερές B αποτελείται από δύο ανεξάρτητες υπομονάδες που παρουσιάζουν ελάχιστες διαφορές στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής τους. Η υπομονάδα B και η υπομονάδα D αποτελούνται από δύο δομικές περιοχές: τη N-τελική δομική με μοτίβο α/β (βαβαββα) (κατάλοιπα 1 έως 77) και τη C-τελική δομική περιοχή με μοτίβο τύπου α (κατάλοιπα 88-209) (Εικόνα 3.16).

3.3.8.2 Φ και Ψ δίδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού - Διάγραμμα Ramachandran

Στο διάγραμμα Ramachandran φαίνεται ότι τα περισσότερα ζεύγη φ, ψ γωνιών, για όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα εκτός αυτά της γλυκίνης, συναθροίζονται γύρω από τις στερεοδιαταξικά επιτρεπτές περιοχές. Υπάρχει όμως μια σημαντική εξαίρεση, αυτή της γλυκίνης, που μπορεί να υιοθετήσει ένα πιο ευρύ φάσμα στερεοδιατάξεων απ' ό,τι τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Συνεπώς, παίζει ένα πολύ σημαντικό δομικό ρόλο επιτρέποντας

ασυνήθιστες στερεοδιατάξεις της κύριας αλυσίδας. Αυτός είναι και ένας από τους κύριους λόγους που ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των καταλοίπων είναι εξελικτικά συντηρημένα μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνικών αλληλουχιών.

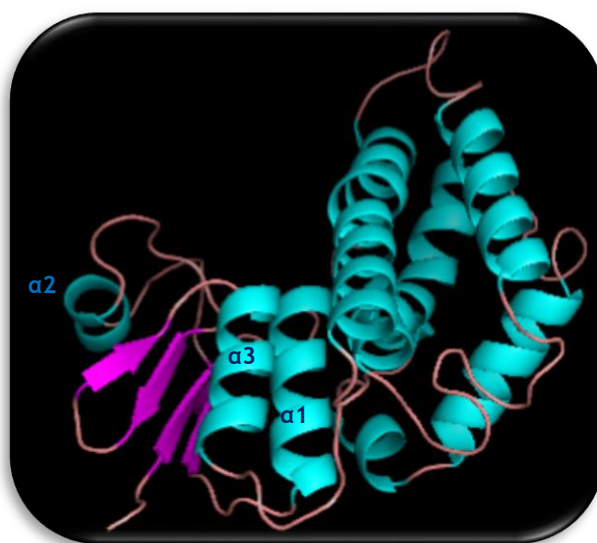
Οι περιοχές στο διάγραμμα Ramachandran ονομάζονται ανάλογα με τη διαμόρφωση που θα αποκτούσε ένα πολυπεπτίδιο, εάν οι αντίστοιχες γωνίες ϕ και ψ επαναλαμβάνονταν σε όλα τα διαδοχικά αμινοξέα κατά μήκος της αλυσίδας. Οι κύριες επιτρεπτές περιοχές είναι η ομάδα των δεξιόστροφων α -ελίκων στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο, η ευρεία περιοχή των β -κλώνων (παράλληλων και αντιπαράλληλων) στο επάνω αριστερά τεταρτημόριο και η μικρή περιοχή της αριστερόστροφης α -έλικας στο επάνω δεξιά τεταρτημόριο (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18: Διάγραμμα Ramachandran για το ενζύμο sh4. Τα αμινοξικά κατάλοιπα αναπαρίστανται ως σταυροί. Οι έγχρωμες περιοχές δείχνουν στερεοχημικά επιτρεπτές περιοχές. Με μπλε αναπαρίστανται οι α -έλικες, με κόκκινο τα β -ελάσματα και με πράσινο οι βρόγχοι και οι τυχαίες περιελίξεις. Οι εξωτερικές γραμμές περικυκλώνουν την περιοχή εντός της οποίας θα πρέπει να βρεθεί 90 % όλων των σταυρών του ίδιου χρώματος και οι εσωτερικές γραμμές υποδεικνύουν την περιοχή του 50 %. Οι διαγώνιοι σταυροί υποδεικνύουν τα υπολείμματα γλυκινών. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

3.3.8.3 N-τελική δομική περιοχή

Όσον αφορά τις τέσσερις υπομονάδες η N-τελική δομική περιοχή τους αποτελείται από τρεις α -έλικες. Μία μεγάλου μήκους $\alpha 1$ (κατάλοιπο 13 έως 25), μία μεσαίου $\alpha 3$ (κατάλοιπα 66 έως 77) και μία μικρού $\alpha 2$ (κατάλοιπα 42 έως 47) (Εικόνα 3.19). Η α -έλικα $\alpha 1$ αποτελούμενη από 13 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 19,5 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 3,5 στροφές. Η α -έλικα $\alpha 2$ αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 9 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 1,8 στροφές. Τέλος, η α -έλικα $\alpha 3$ αποτελούμενη από 11 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 16,5 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 3,3 στροφές.

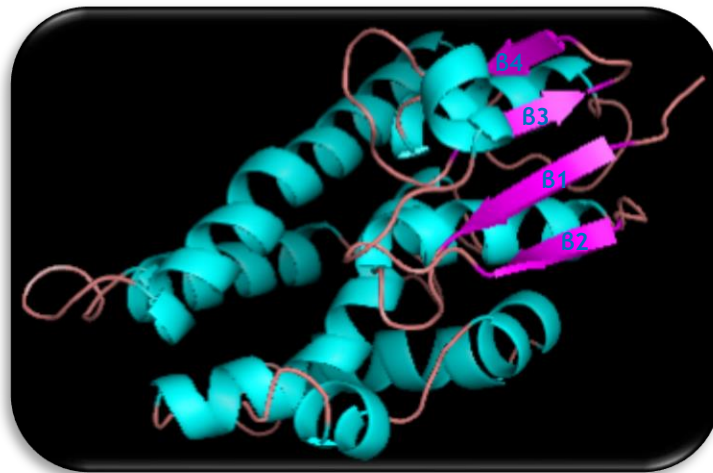


Εικόνα 3.19: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς sh4. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\alpha 1$, $\alpha 2$, και $\alpha 3$ χαρακτηρίζονται οι α -έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Η N-τελική δομική περιοχή αποτελείται από β -φύλλα δηλαδή από τέσσερα β -ελάσματα και επιδεικνύουν μία δεξιόστροφη κάμψη. Τρία μεσαίου μήκους, τα $\beta 1$ (κατάλοιπα 5 έως 9), $\beta 2$ (κατάλοιπα 30 έως 33) και $\beta 3$ (κατάλοιπα 55 έως 58) και ένα μικρότερου $\beta 4$ (κατάλοιπα 61 έως 63). Το έλασμα $\beta 3$ παρατάσσεται αντιπαράλληλα στα άλλα τρία ($\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 4$). Από τη μία πλευρά, τα β -φύλλα περιβάλλονται από τις δύο α -έλικες $\alpha 3$ και $\alpha 2$, από τις οποίες η $\alpha 2$ είναι τοποθετημένη στην περιοχή που είναι εκτεθειμένη προς το διαλύτη (Εικόνα 3.20).

Τα β -ελάσματα στοιχίζονται γειτονικά ο ένας με τον άλλον με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις C=O ομάδες του ενός ελάσματος με τις NH ομάδες του άλλου ελάσματος και αντίστροφα. Τα β -ελάσματα

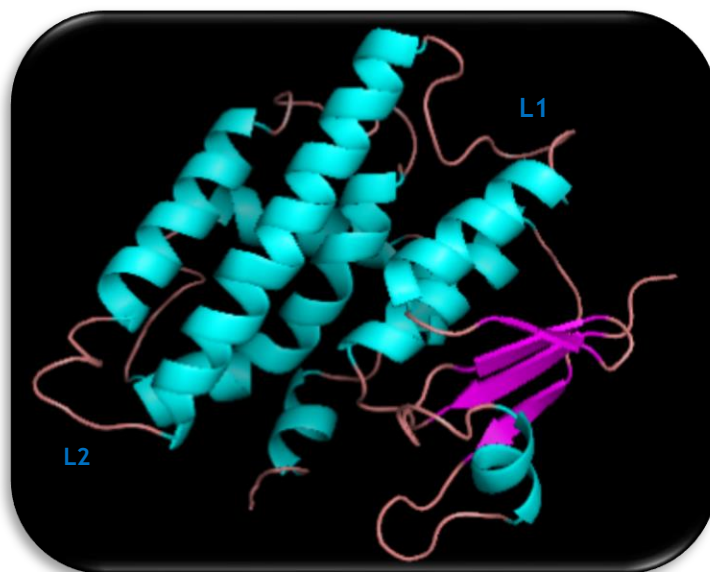
συνδυάζονται σε μεικτή β-πτυχωτή επιφάνεια, με ένα ζεύγος β-κλώνων ($\beta 1$ - $\beta 2$) να είναι παράλληλο και δύο αντιπαράλληλα ($\beta 1$ - $\beta 3$ και $\beta 3$ - $\beta 4$). Στον παράλληλο συνδυασμό ($\beta 1$ - $\beta 2$) όλα τα αμινοξέα των β-κλώνων έχουν την ίδια κατεύθυνση, από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο ενώ στην αντιπαράλληλη σύνδεση ($\beta 1$ - $\beta 3$ και $\beta 3$ - $\beta 4$) έχουν αντίθετες κατευθύνσεις, δηλαδή το ένα έλασμα κατευθύνεται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο και ο επόμενος από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό.



Εικόνα 3.20: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς sh4. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μαβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$ χαρακτηρίζονται τα β -ελάσματα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Οι α -έλικες καθώς κι οι β -πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων (L1 και L2) (Εικόνα 3.21). Βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυνητικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενα β -ελάσματα ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β -φουρκέτας (Εικόνα 3.22).

Το $\beta 1$ έλασμα συνδέεται με την α -έλικα $\alpha 1$ καθώς και η α -έλικα $\alpha 1$ με το $\beta 2$ έλασμα με ένα μικρό βρόγχο μήκους τεσσάρων καταλοίπων ο καθένας. Το $\beta 2$ έλασμα συνδέεται με την επόμενη α -έλικα $\alpha 2$ με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο επτά καταλοίπων. Η $\alpha 2$ α -έλικα με το $\beta 3$ με ένα βρόγχο οκτώ καταλοίπων. Η σύνδεση των ελασμάτων $\beta 3$ και $\beta 4$ εμφανίζεται με το μοτίβο β -φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, το έλασμα $\beta 4$ ενώνεται με την α -έλικα $\alpha 3$ μόνο με 2 κατάλοιπα.



Εικόνα 3.21: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς sh4. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως L1 και L2 χαρακτηρίζονται οι βρόγχοι. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

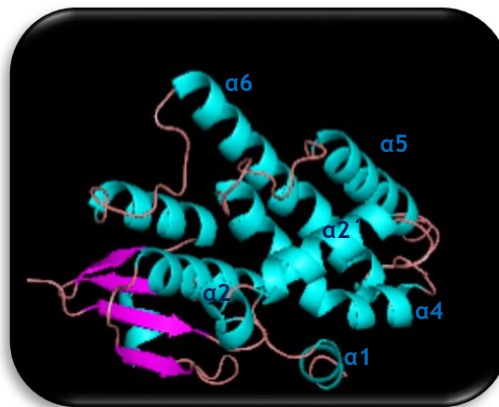


Εικόνα 3.22: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς sh4. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως L χαρακτηρίζεται ο βρόγχος φουρκέτας. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

3.3.8.4 C-τελική δομική περιοχή

Η C-τελική δομική ενότητα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή και αποτελείται από τα κατάλοιπα 88 έως 209 και για τις τέσσερις υπομονάδες. Αποτελείται από μοτίβο α-έλικας, με 6 α-έλικες διευθετημένες σε αριστερόστροφη περιέλιξη.

Οι α -έλικες $\alpha 1$ και $\alpha 2$ είναι οι πιο μικρές που εμφανίζονται με έξι κατάλοιπα η κάθε μία ($\alpha 1$: κατάλοιπα 202 έως 207 και $\alpha 2$: κατάλοιπα 193 έως 198). Οι $\alpha 2'$ και $\alpha 6$ α -έλικες ($\alpha 2'$: κατάλοιπα 180 έως 191, $\alpha 6$: κατάλοιπα 89 έως 115) εμφανίζουν κατά κάποιο τρόπο κάθετη διευθέτηση μεταξύ τους. Η α -έλικα $\alpha 2$ παρουσιάζει μια απότομη στρέψη στο κέντρο της και γι' αυτό και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως δύο έλικες, με τις ονομασίες $\alpha 2$ (κατάλοιπα 193 έως 198) και $A\alpha'$ (κατάλοιπα 180 έως 191). Η α -έλικα $\alpha 4$ ($\alpha 4$: κατάλοιπα 152 έως 171) είναι ευθεία και προσανατολισμένη σχεδόν παράλληλα στην α -έλικα $\alpha 6$. Η α -έλικα $\alpha 5$ (κατάλοιπα 118 έως 139) συνδέεται με την έλικα $\alpha 6$ (κατάλοιπα 89 έως 115) μέσω ενός επιμήκους βρόγχου δεκατριών καταλοίπων. Η α -έλικα $\alpha 1$ και $\alpha 2$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα μικρό βρόγχο μόνο τριών καταλοίπων (199 έως 201). Η α -έλικα $\alpha 4$ και $\alpha 5$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα σύνδεσμο οκτώ καταλοίπων (116 έως 123) (Εικόνα 3.23).



Εικόνα 3.23: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς sh4. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $A1$, $A2$, $A2'$, $A4$, $A5$ και $A6$ χαρακτηρίζονται οι α -έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της C-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

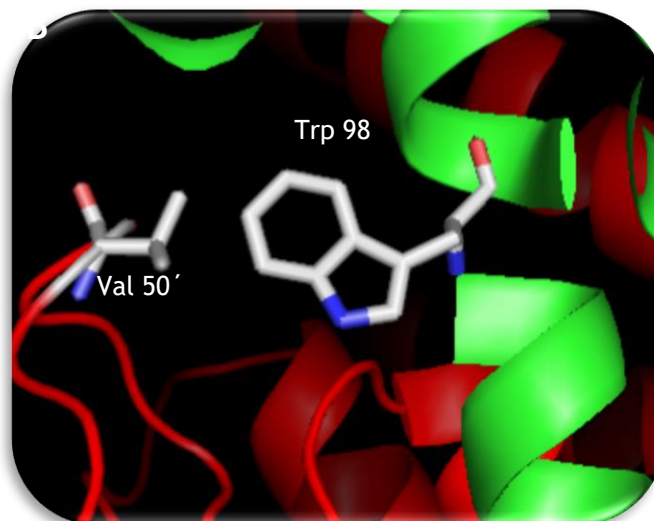
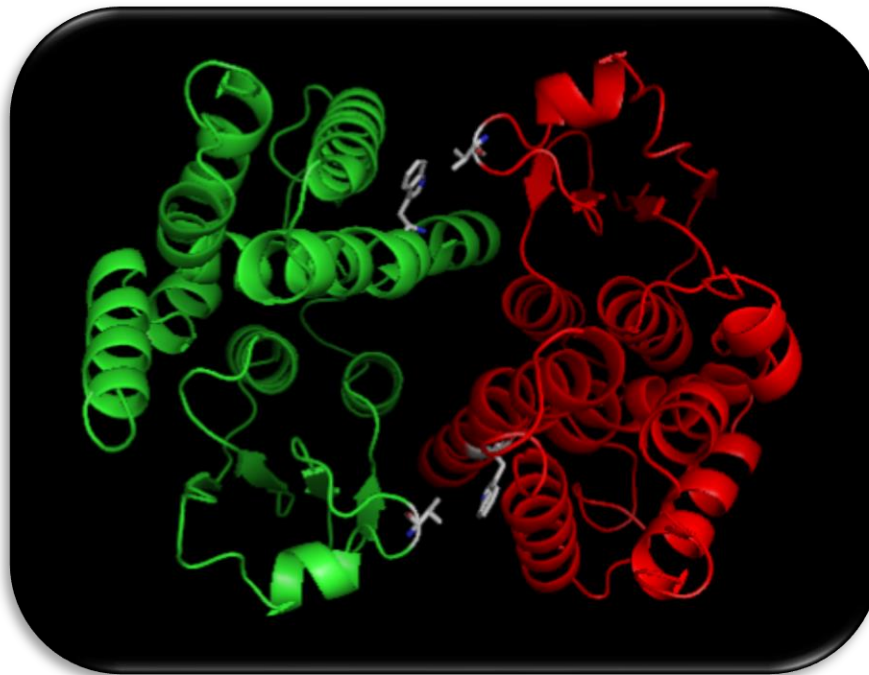
3.3.8.5 Αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων

Το διμερές έχει μια ανοικτή διαμόρφωση, με κοινή επιφάνεια αλληλεπιδράσεων των δύο υπομονάδων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας των δύο υπομονάδων είναι τριών τύπων: γέφυρες άλατος, δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου και ενός μοτίβου τύπου 'κλειδαριάς-κλειδιού' το οποίο και προσδένει φυσικά τις δύο υπομονάδες (Hegazy *et al.*, 2004, Sayer *et al.*, 2000, Vargo *et al.*, 2004). Οι γέφυρες άλατος που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρώτης υπομονάδας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5: Κυριότερες γέφυρες άλατος μεταξύ των κατάλοιπων της υπομονάδας A του ενζύμου sh4. Ως μέγιστο όριο έως του οποίου παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκε η απόσταση 4 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A sh4 (άτομο)	Απόσταση (Å)	Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A sh4 (άτομο)
ASP9 (OD1)	3.44	ARG20 (NH2)
ASP9 (OD2)	2.77	ARG20 (NE)
GLU31 (OE2)	3.95	LYS33 (NZ)
GLU35 (OE1)	2.54	LYS215 (NZ)
GLU35 (OE2)	3.47	LYS215 (NZ)
ASP36 (OD1)	3.71	ARG38 (NH1)
ASP108 (OD1)	4.00	HIS107 (NE2)
ASP108 (OD1)	3.82	LYS111 (NZ)
ASP108 (OD2)	3.94	LYS111(NZ)

Στο μοτίβο τύπου ‘κλειδαριάς-κλειδιού’ του ενζύμου sh4 η πλευρική αλυσίδα της Val50 (Εικόνα 3.24), που βρίσκεται σε ένα βρόγχο της N-τελικής δομικής περιοχής, λειτουργεί ως ‘κλειδί’ το οποίο εκτείνεται κατά μήκος της κοινής επιφάνειας των υπομονάδων και ‘κλειδώνει’ μέσα σε μία υδρόφοβη κοιλότητα, που αποτελείται από τα κατάλοιπα Pro89, Ala93, Ala95, Phe97, Ala99, Phe101, Val102, Ile106, Leu109, Ile113 και Trp114 όσον αφορά την α-έλικα α6 και από τα κατάλοιπα Ala122, Phe128, Ile129, Ala131, Leu134,135 όσον αφορά την α-έλικα α5.



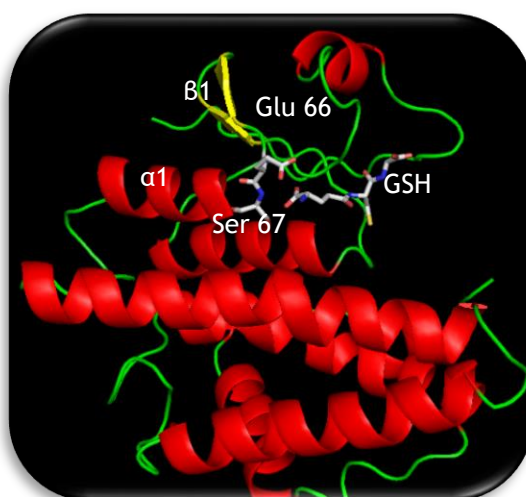
Εικόνα 3.24: Παρουσίαση της δομής του διμερούς sh4 (Α και Β). Η υπομονάδα Α είναι χρωματισμένη πράσινη και η υπομονάδα Β κόκκινη. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που διαμορφώνουν το μοτίβο τύπου ‘κλειδιού-κλειδαριάς’ αναπαρίστανται με ράβδους σύμφωνα με τον ατομικό τους τύπο. Στην εικόνα Β βλέπουμε το μοτίβο τύπου ‘κλειδιού-κλειδαριάς’ σε μεγέθυνση. Τα σχήματα παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL. (Delano, 2002).

3.3.8.6 Η περιοχή δέσμευσης της γλουταθειόνης (G-Θέση)

Η G-θέση βρίσκεται στη N-τελική δομική περιοχή και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της GSH, που αποτελεί ανάλογο υποστρώματος-προϊόντος. Σε κάθε μονομερές προσδέεται ένα μόριο GSH. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι

συντηρημένα σχεδόν σε όλες τις GSTs αλλά και ειδικότερα στην τ τάξη, όπου ανήκει και το sh4.

Για την αναγνώριση του γ-γλουταμυλ-τμήματος της GSH είναι υπεύθυνο το μοτίβο ββα και αποτελεί τη πιο καλά συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλα τα GSTs ένζυμα (Armstrong *et al.*, 1997). Το συγκεκριμένο μοτίβο απαντάται και στις τέσσερις υπομονάδες του ενζύμου sh4 και είναι προσανατολισμένο προς τα κάτω στην ανεστραμμένη κοιλότητα του ενεργού κέντρου ενώ το γλυκυλο-τμήμα της είναι προσανατολισμένο προς τα πάνω, προβάλλοντας στην περιοχή του διαλύτη. Στον Πίνακα 3.6 αποτυπώνονται οι αποστάσεις και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της **υπομονάδας D** του ενζύμου sh4 και της GSH (Εικόνα 3.25).



Εικόνα 3.25: Παρουσίαση του συντηρημένου μοτίβου ββα το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του γ-γλουταμυλ-τμήματος της GSH. Η GSH και οι πλευρικές αλυσίδες που βρίσκονται στην στροφή ανάμεσα στο β2-έλασμα και την α-έλικα α1 παίρνουν μέρος στους υδρογονικούς δεσμούς με τα α-άμινο και α-καρβόξυ τμήματα του γ-γλουταμυλ-τμήματος της GSH. Τα σχήματα παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL. (Delano, 2002).

Επιπλέον, στη G-θέση βρίσκεται το συντηρημένο κατάλοιπο Ser 13 που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της σουλφυδρυλομάδας της GSH ώστε να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS⁻) (Labrou *et al.*, 2001; Frova *et al.*, 2006).

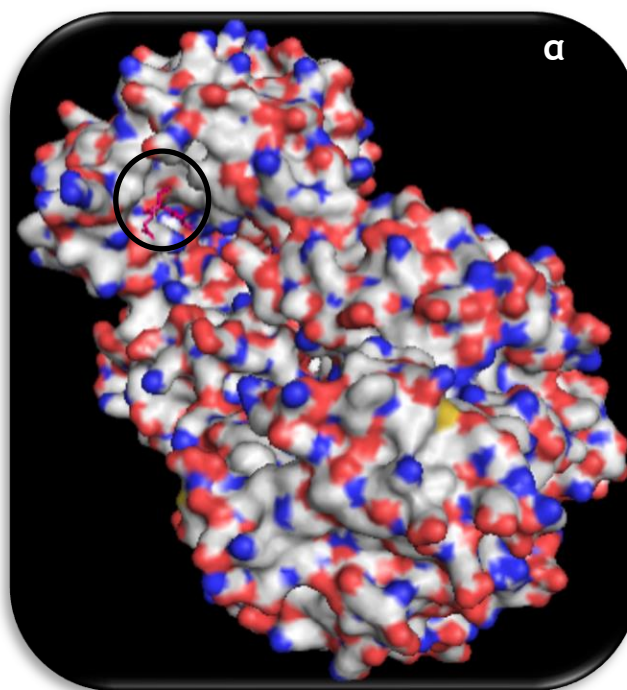
Πίνακας 3.6: Κυριότερες αποστάσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υπομονάδας D του ενζύμου sh4 και της GSH. Ως μέγιστο όριο έως του οποίου παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκε η απόσταση 3,4 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

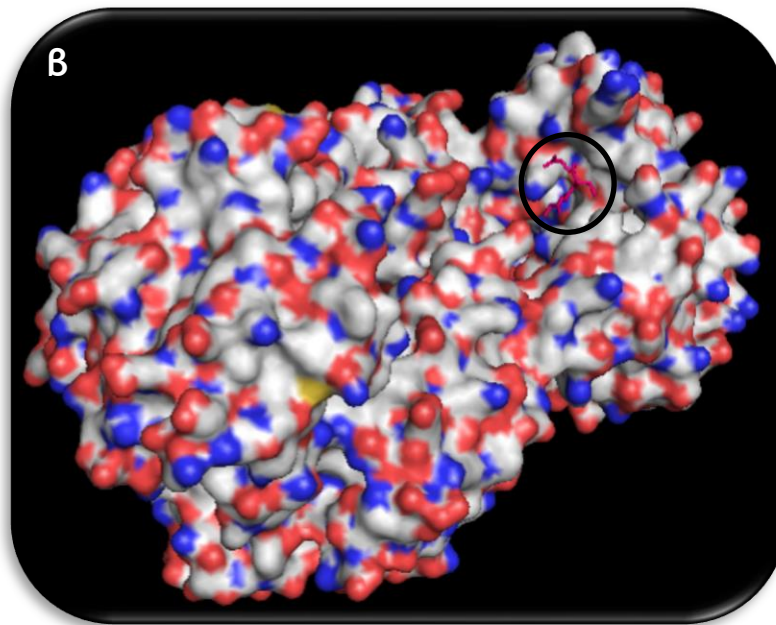
Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας D (άτομο)	Απόσταση (Å)	GSH (άτομο)	Είδος της αλληλεπιδράσης
SER13 (CB)	3.86	GSH (SG2)	O[] ... S[]
LYS53 (CA)	3.28	GSH (O2)	C[] ... O[]
LYS53 (CG)	3.73	GSH (C2)	C[] ... C[]
LYS53 (CG)	3.71	GSH (CA3)	C[] ... C[]
LYS53 (CG)	3.71	GSH (N3)	C[] ... N[]
LYS53 (CD)	3.85	GSH (CD1)	C[] ... C[]
LYS53 (CD)	3.82	GSH (CG1)	C[] ... C[]
ILE54 (N)	2.96	GSH (O2)	N[] ... O[]
ILE54 (O)	3.42	GSH (CD1)	O[] ... C[]
ILE54 (O)	2.72	GSH (N2)	O[] ... N[]
ILE54 (O)	3.17	GSH (CG1)	O[] ... C[]
ILE54 (CD1)	3.14	GSH (CB2)	C[] ... C[]
GLU66 (CD)	3.37	GSH (N1)	C[] ... N[]
GLU66 (CD)	3.58	GSH (CA1)	C[] ... C[]
GLU66 (OE1)	2.72	GSH (N1)	O[-] ... N[]
GLU66 (OE1)	3.30	GSH (CA1)	O[] ... C[]
GLU66 (OE2)	3.42	GSH (CA1)	O[] ... C[]
SER67 (N)	2.71	GSH (O11)	N[] ... O[]
SER67 (N)	3.33	GSH (C1)	O[] ... C[]
SER67 (CB)	3.30	GSH (O11)	C[] ... O[]
SER67 (OG)	3.41	GSH (C1)	O[] ... C[]
SER67 (OG)	2.77	GSH (O12)	O[] ... O[]

3.3.8.7 Η περιοχή δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων (H-Θέση)

Η H-θέση του ενζύμου sh4 βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και αποτελεί θέση δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Πρόκειται για υδρόφοβη περιοχή με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της να χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Πιο συγκεκριμένα, μερικά υδρόφοβα κατάλοιπα είναι:

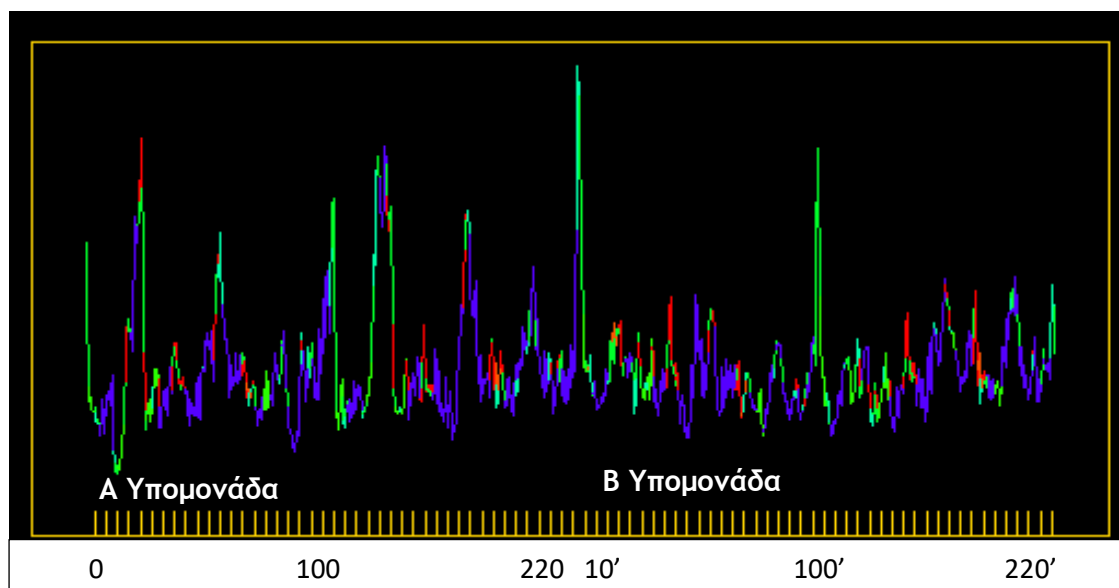
Val205 στην α -έλικα α_1 , Val195 και Ala196 στην α -έλικα α_2 , Pro180, Phe182, Ile183, Ala184 και Leu190 στην α -έλικα α_2' , Val153, Ile155, Ala156, Leu157, Val158, Phe160 στην α -έλικα α_4 , Pro89, Ala93, 95 και 99, Phe101, Ile106 και 113 στην α -έλικα α_5 . Όλα αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα είναι τοποθετημένα με κατεύθυνση προς το κέντρο της Η-θέσης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα από τα οποία αποτελείται δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα, γι' αυτό μπορούν να δεσμευτούν μια ποικιλία υποστρωμάτων (Hayes *et al.*, 2005). Στην παρακάτω Εικόνα παρουσιάζεται το ηλεκτροστατικό δυναμικό του ισοενζύμου (Εικόνα 3.26.α και β). Με μπλε και κόκκινο σημαίνονται τα θετικά και τα αρνητικά φορτία των αμινοξέων.



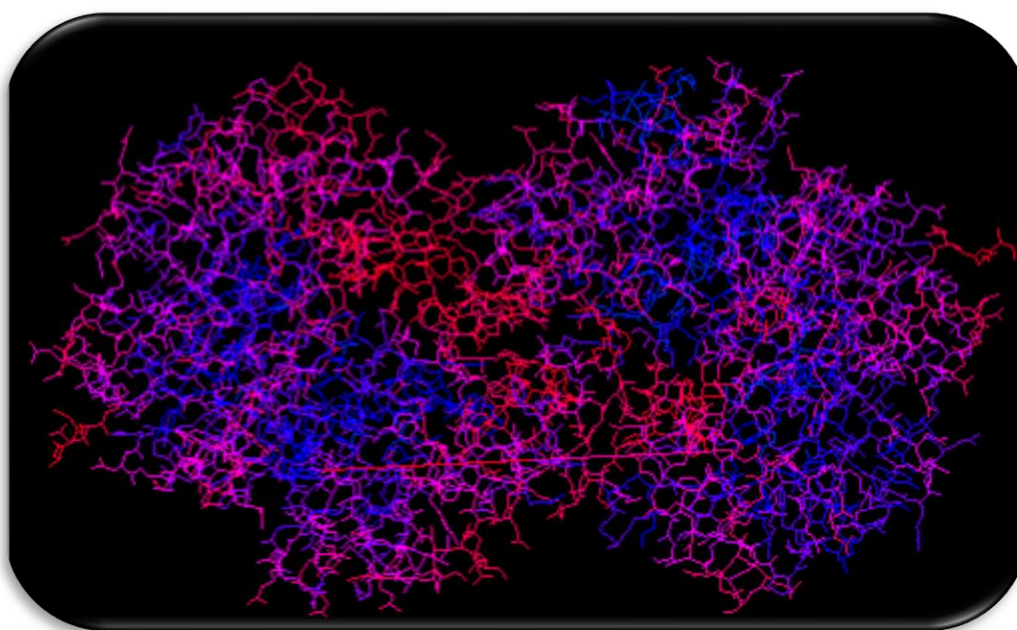


Εικόνα 3.26: Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου sh4. Επισημαίνεται η Η-θέση της ενεργής περιοχής στις δύο υπομονάδες του ενζύμου. Η επιφάνεια του μορίου είναι χρωματισμένη σύμφωνα με το ηλεκτροστατικό δυναμικό, τα αρνητικά, θετικά και ουδέτερα φορτία παρουσιάζονται σαν σκιές κόκκινου, μπλε και άσπρου χρώματος, αντίστοιχα. Οι ηλεκτροστατικοί υπολογισμοί και το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της δομής της Η-θέσης είναι η μεγάλη ευλυγισία που παρουσιάζει ο βρόγχος που βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 139 έως 151 καθώς και η α -έλικα $\alpha 4$. Παρατηρούμε τους υψηλούς B-συντελεστές του βρόγχου και της έλικας, που καθαρά υποδεικνύουν τη μεγάλη ευλυγισία των δομικών αυτών στοιχείων (Εικόνα 3.27-3.28). Η ευλυγισία αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από την ύπαρξη της Gly151 στο τέλος της έλικας. Το ύψος σε κάθε θέση καταλοίπου δείχνει το μέσο B-παράγοντα όλων των ατόμων.



Εικόνα 3.27: Η δυναμική του ενζύμου sh4. Η γραφική παράσταση των κρυσταλλογραφικών B-συντελεστών κατά μήκος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των δύο υπομονάδων (A, B) της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου του ενζύμου sh4. Με μπλε αναπαρίστανται οι α-έλικες, με κόκκινο τα β-ελάσματα και με πράσινο οι βρόγχοι και οι τυχαίες περιελίξεις. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

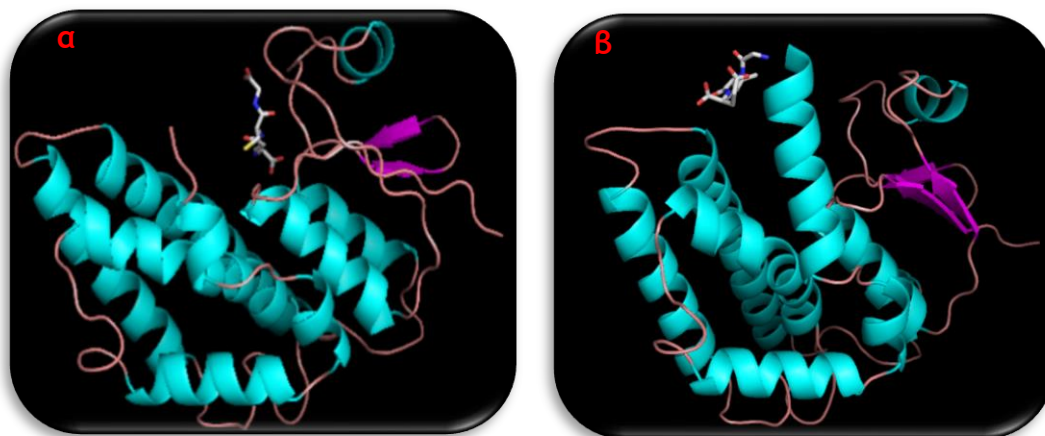


Εικόνα 3.28: Η δυναμική του ενζύμου sh4. Όλα τα άτομα του ενζύμου sh4 είναι χρωματισμένα ως συνάρτηση του παράγοντα B. Τα άτομα ταξινομούνται ως συνάρτηση του B - παράγοντα σε δώδεκα διαφορετικούς χρωματισμούς. Τα άτομα με τον χαμηλότερο μπλε χρώμα ενώ τα άτομα με το υψηλότερο παράγοντα B εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Οι υπόλοιποι χρωματισμοί αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσες τιμές του παράγοντα B.

3.3.8.8 Μελέτη αλληλεπιδράσεων C-τελικού άκρου

Από την κρυσταλλοδομή του sh4 που επιλύθηκε παρατηρήθηκε ότι το τριπεπτιδίο GIE που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εισέρχεται στο ενεργό κέντρο του

ενζύμου και προσομοιάζει τη δομή της GSH (γ-γλουταμινικό οξύ-κυστεΐνη-γλυκίνη / ECG) και τον τρόπο δέσμευσης αυτής (Εικόνα 3.29.α και β). Για να διαπιστωθεί ο πιθανός βιολογικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης έγινε σύνθεση του τριπεπτιδίου GIE για να μελετηθεί η λειτουργία του είτε ως υπόστρωμα είτε ως αναστολέας των ενζύμων *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5*. Παρατηρώντας την κρυσταλλοδομή συμπεραίνουμε ότι το τριπεπτίδιο GIE υπάρχει στις υπομονάδες όπου απουσιάζει η GSH. Δηλαδή το GIE συναγωνίζεται τη θέση δέσμευσης της GSH. Επίσης, από την παρακάτω Εικόνα συμπεραίνουμε ότι το τριπεπτίδιο της GSH εισέρχεται στην κοιλότητα της G θέσης ενώ το GIE λειτουργεί ως 'καπάκι' που προφυλάσσει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 3.29).

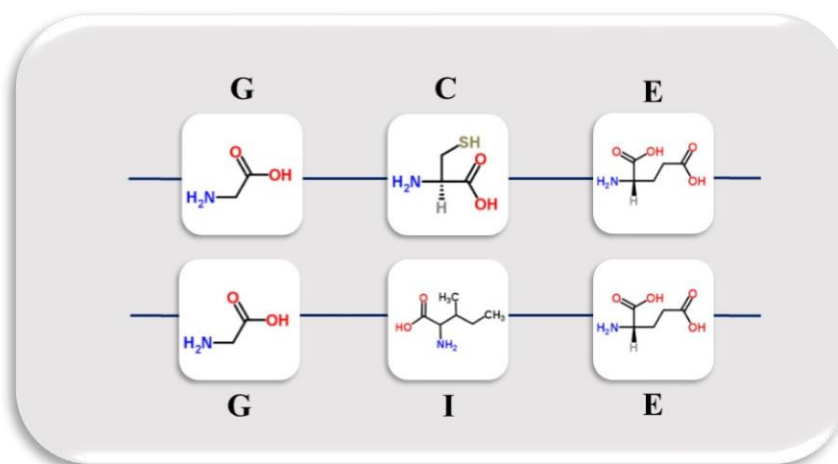


Εικόνα 3.29: (α) Απεικόνιση της θέσης της GSH στη N-τελική δομική περιοχή. (β) Απεικόνιση της θέσης του τριπεπτιδίου GIE στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

3.3.8.9. Έλεγχος του πεπτιδίου GIE ως υπόστρωμα

Για τον έλεγχο εάν το τριπεπτίδιο αποτελεί υπόστρωμα για τα τρία ισοένζυμα ακολούθησε δοκιμή όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο § 3.2.2.14 χρησιμοποιώντας ως δεύτερο υπόστρωμα το CDNB.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τριπεπτίδιο GIE δεν λειτουργεί ως υπόστρωμα των ισοενζύμων. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι δεν περιέχει στη δομή του Cys. Στην Εικόνα παρακάτω παρατηρούμε πως τα δύο τριπεπτίδια διαφέρουν μεταξύ τους μόνο κατά ένα αμινοξύ και συγκεκριμένα το δεύτερο. Στη GSH υπάρχει η κυστεΐνη ενώ στο GIE υπάρχει η ισολευκίνη (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5: Απεικόνιση των αμινοξέων που αποτελούν στο τριπεπίδιο της γλουταθειόνης (GCE) και το τριπεπίδιο που GIE.

3.3.8.10 Έλεγχος πεπτιδίου (GIE) ως δυνητικός αναστολέας ισοενζύμων GSTs

Για να ελέγξουμε αν το τριπεπίδιο αποτελεί αναστολέα των ισοενζύμων πραγματοποιήθηκε δοκιμή όπως αυτή περιγράφεται στην § 3.2.2.15. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης των ενζύμων σε δύο χρόνους, σε $t=0$ και σε $t=30$ min (Πίνακας 3.7). Στον παρακάτω Πίνακα εμφανίζεται η % αναστολή την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5* παρουσία του πεπτιδίου.

Πίνακας 3.7: Αναστολή (%) των ισοενζύμων, *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5* σε χρόνο επώασης $t=0$ και $t=30$ min, παρουσία τριπεπτιδίου GIE.

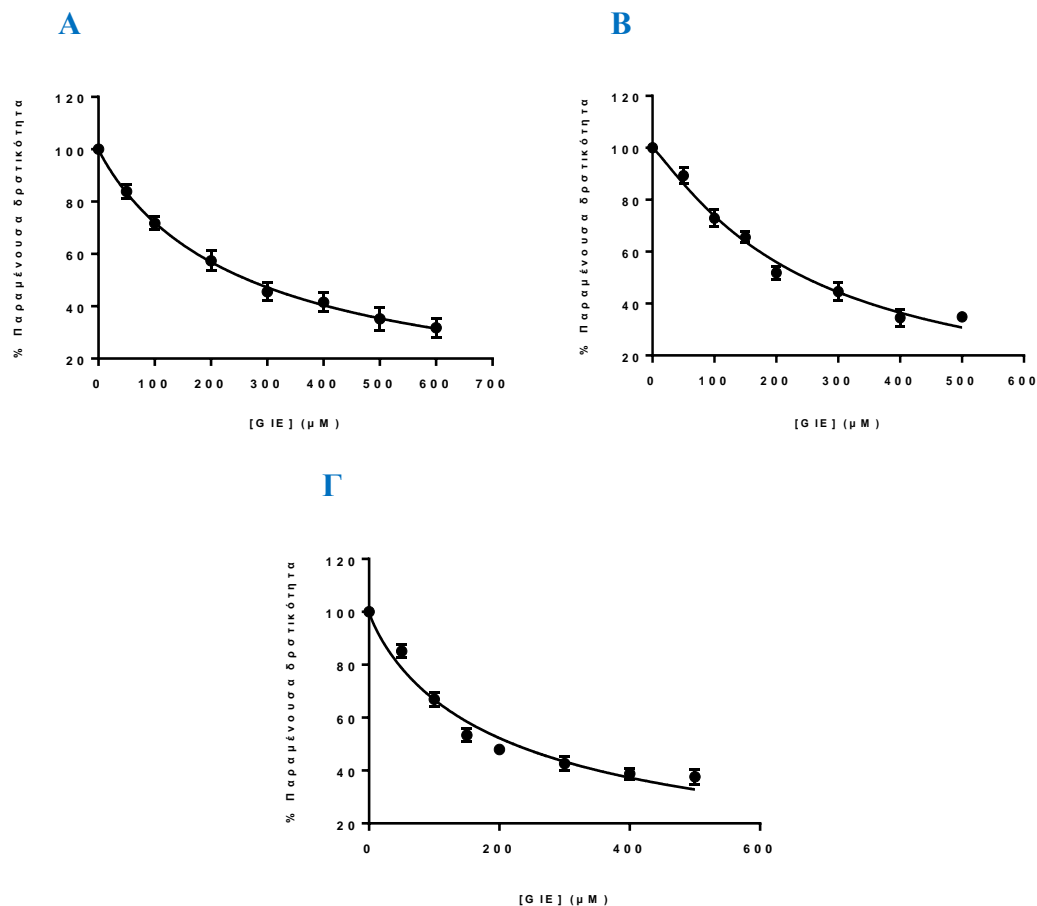
Ισοένζυμο	% Αναστολή	
	$t=0$ min	$t=30$ min
<i>GmGSTU4-4</i>	20	19,4
<i>sh4</i>	23	0
<i>shII5</i>	30	2,4

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τριπεπίδιο επιφέρει αναστολή και στα τρία ισοένζυμα. Απουσία επώασης παρατηρείται σταδιακή μικρή αύξηση της αναστολής από την πατρική γενεά έως τη δεύτερη γενεά. Σε χρόνο επώασης 30 min παρατηρούμε μηδενική ή σχεδόν μηδενική αναστολή για το *sh4* και το *shII5*. Αντιθέτως, για τον άγριο τύπο η αναστολή που επιφέρει το GIE είναι σχεδόν ίδια όπως απουσία επώασης.

3.3.8.11 Υπολογισμός τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) για τα ισοένζυμα

Για τον υπολογισμό της ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) των ισοενζύμων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην § 2.2.15.

Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του πεπτιδίου, στην οποία έχουμε παραμένουσα δραστικότητα του ενζύμου ίση με το 50 % της αρχικής (Πίνακας 3.8). Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίου και προσδιορίστηκε η αναστολή που επιφέρουν στη δραστικότητα (Εικόνα 3.30).



Εικόνα 3.30: Παραμένουσα δραστικότητα (%) του (A) άγριου τύπου *GmGSTU4-4*, του (B) *sh4* και του (C) *shII5* έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων του πεπτιδίου GIE.

Πίνακας 3.8: Τιμές ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) για τα ισοένζυμα.

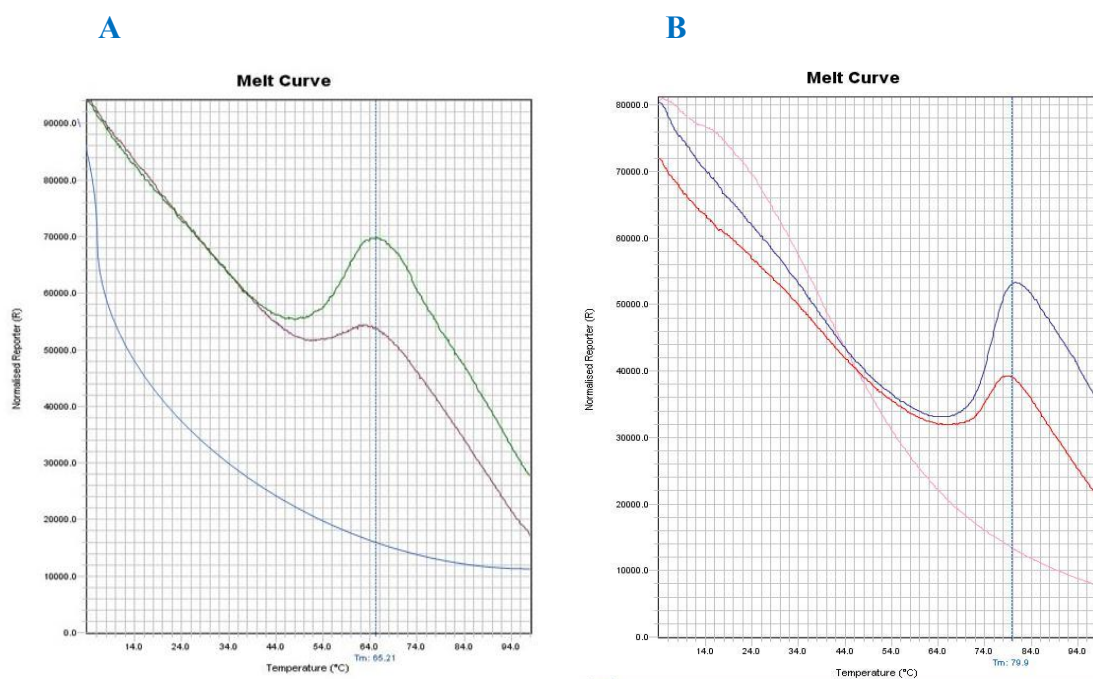
Ένζυμο	IC_{50} (μM)
<i>GmGSTU4-4</i>	$267,1 \pm 8,7$
<i>sh4</i>	$246,7 \pm 8,9$
<i>shII5</i>	$221,8 \pm 12,8$

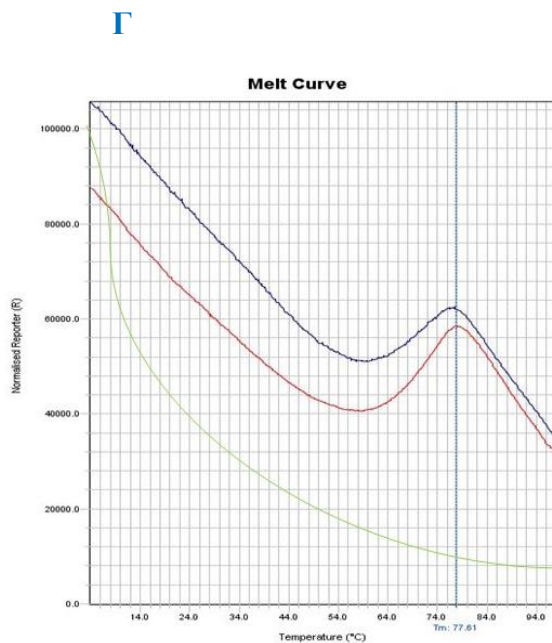
3.3.8.12 Μελέτη αλληλεπίδρασης ισοενζύμων με το πεπτίδιο με τη μέθοδο της διαφορικής σάρωσης φθορισμού

Με τη διαδικασία της διαφορικής σάρωσης φθορισμού μελετήθηκε και επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση του τριπεπτιδίου με το κάθε μελετώμενο ισοένζυμο και

προσδιορίστηκε η επίδρασή του στο φθορισμό και στο σημείο τήξεως της πρωτεΐνης. Η μέθοδος που ακολουθήσαμε περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο § 3.2.3.17.

Παρατηρήθηκε πως και για τα τρία ισοένζυμα το τριπετίδιο επιφέρει μείωση της έντασης του φθορισμού, δηλαδή παρουσιάζει το φαινόμενο της απόσβεσης. Για το shII5 παρατηρούμε περιορισμένη μείωση της έντασης του φθορισμού ενώ για τα GmGSTU4-4 και sh4 μεγαλύτερη. Και για τα τρία ισοένζυμα όμως παρατηρούμε πως δεν υπάρχει μετατόπιση της καμπύλης φθορισμού προς τα αριστερά ή προς τα δεξιά. Το φαινόμενο της απόσβεσης εξηγείται με το γεγονός ότι σύμπλοκο του ενζύμου με το τριπεπίδιο κάθε φορά γίνεται πιο σταθερό ενεργειακά και έτσι επέρχεται η μείωση της έντασης του φθορισμού (Εικόνα 3.31).





Εικόνα 3.31: Διαφορική σάρωση φθορισμού για τα (Α) *GmGSTU4-4* παρουσία και απουσία GIE, control (Β) *sh4* παρουσία και απουσία GIE, control. (Γ) *shII5* παρουσία και απουσία GIE, control. Σε κάθε περίπτωση το πεπτίδιο είναι σε συγκέντρωση 100 μM .

3.3.9 Υπολογισμός της ενθαλπίας μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης

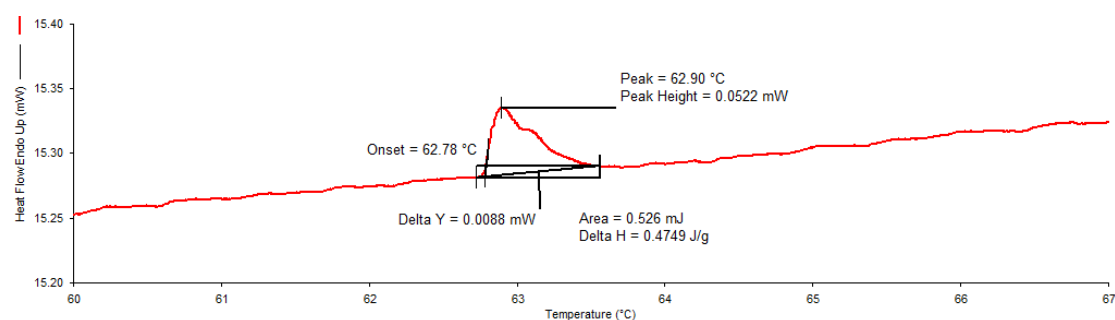
Η διαφορική μικροθερμιδομετρία σάρωσης είναι ως μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη μελέτη της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών, και ως μία από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές για τη μέτρηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων του πρωτεϊνικού ξεδιπλώματος (Ibarra-Molero and Sanchez-Ruiz, 2006). Η DSC παρακολουθεί την επίδραση της θερμότητας που συνδέεται με τις μεταβάσεις φάσεων και χημικών αντιδράσεων ως συνάρτηση της θερμοκρασίας (Harding and Chowdhry, 2000).

Σε μια μέτρηση η διαφορά στη ροή θερμότητας προς το δείγμα και η διαφορά προς το μάρτυρα στην ίδια θερμοκρασία, καταγράφεται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Το δείγμα και ο μάρτυρας σφραγίζονται σε κάψουλα από τιτάνιο. Η θερμοκρασία τόσο του δείγματος όσο και του μάρτυρα αυξάνεται με σταθερό ρυθμό. Δεδομένου ότι η DSC είναι σε σταθερή πίεση, η ροή θερμότητας είναι ισοδύναμη με αλλαγές της ενθαλπίας. Η θερμοκρασία στο μέγιστο σημείο της καμπύλης θερμοχωρητικότητας (T_m) χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης σταθερότητας. Η διαφορά στην ποσότητα θερμότητας που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος και του μάρτυρα αναφοράς μετράται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Τόσο το δείγμα όσο

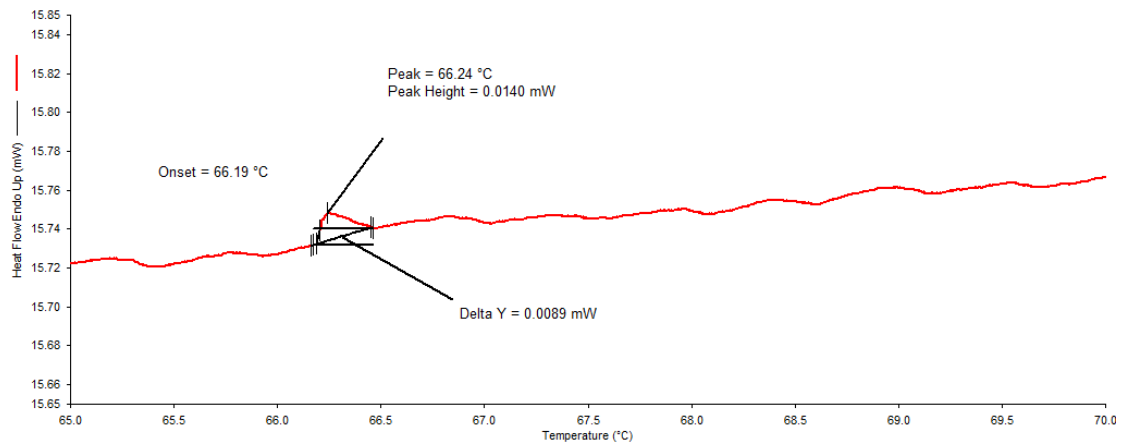
και ο μάρτυρας αναφοράς διατηρούνται σχεδόν στην ίδια θερμοκρασία σε όλο το πείραμα.

Το DSC παρακολουθεί την επίδραση της θερμότητας που συνδέεται με τις μεταβάσεις φάσεων και χημικών αντιδράσεων ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Η προετοιμασία του δείγματος περιγράφεται στην παράγραφο § 3.2.2.20. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε εύρος θερμοκρασιών 20 °C - 90 °C. Τα ένζυμα που υπεβλήθησαν σε διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι το *GmGSTU4-4* και το sh4. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα της ενθαλπίας σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (Εικόνα 3.32 - 3.33).

Ειδικότερα, υπολογίστηκε η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH) τόσο για το ισοένζυμο *GmGSTU4-4* όσο και για το sh4 καθώς και η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει αυτή η μεταβολή. Η μεταβολή της ενθαλπίας είναι αρκετά μικρή και για τα δύο ισοένζυμα. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση. Η θερμοκρασία που παρατηρείται αυτή η μεταβολή κυμαίνεται περίπου στους 62,78 °C για το *GmGSTU4-4* ενώ για το sh4 περίπου στους 66,19 °C.



Εικόνα 3.32: Μεταβολή της ενθαλπίας του ενζύμου *GmGSTU4-4* σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

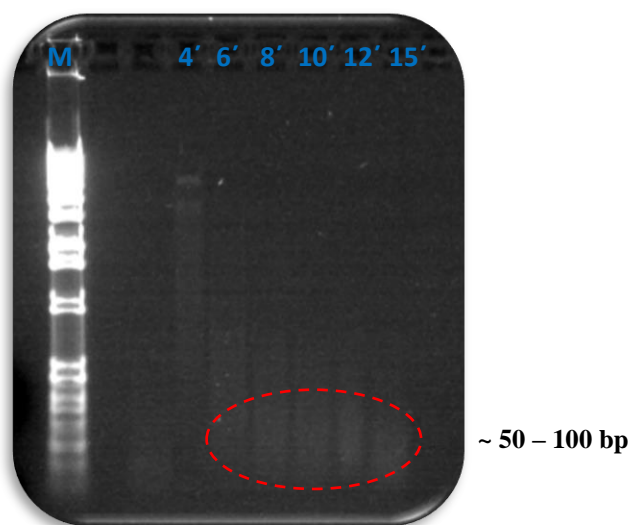


Εικόνα 3.33: Μεταβολή της ενθαλπίας του ενζύμου sh4 σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

3.3.10 Τρίτος κύκλος κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης ισοενζύμων GSTs

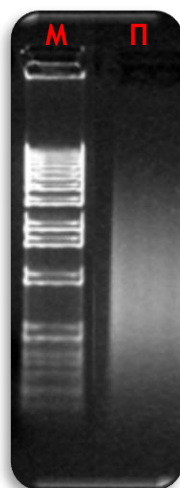
Με στόχο τη διεύρυνση της πολυπλοκότητας προχωρήσαμε σε μια τρίτη διαδικασία κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις αποικίες, που εμφάνισαν αξιόλογη ενζυμική δραστηριότητα με το σύστημα GSH/CDNB, από το δεύτερο κύκλο.

Αναλυτικότερα, αναμίχθηκε πλασμιδιακό DNA δέκα αποικιών με ρυθμιστικό διάλυμα DNase καθώς και διάλυμα εξισορρόπησης T.E. Έπειτα, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο § 3.3.2.2. Το αποτέλεσμα της πέψης αναλύεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2 % (Εικόνα 3.34).



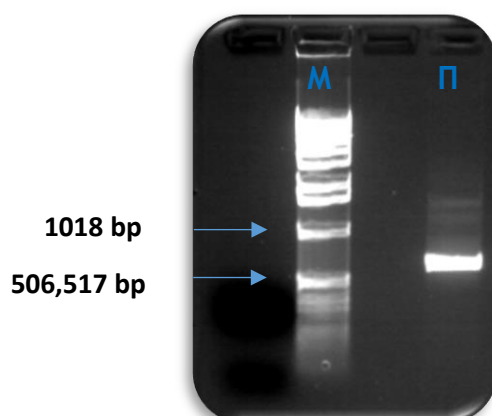
Εικόνα 3.34: Πέψη του πλασμιδιακού DNA με DNase. Στους χρόνους $t=4, 6, 8, 10, 12$ και 15 min η αντίδραση διακόπτεται και αναλύεται με ηλεκτροφόρηση. M: μάρτυρας 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Έπειτα, ακολουθεί τυχαία επανασύνδεση των τμημάτων του πλασμιδιακού DNA, με μοριακό βάρος 50-100 bp, με PCR χωρίς τη χρήση εκκινητών. Οι χρόνοι οι οποίοι φαίνεται να δούλεψε καλύτερα η πέψη είναι οι $t=6$ έως $t=15$ min. Το αποτέλεσμα της PCR φαίνεται στην Εικόνα 3.35.



Εικόνα 3.35: Αντίδραση PCR χωρίς την εισαγωγή εκκινητών. M: μάρτυρας 100 bp DNA Ladder (Biolabs). Π: Προϊόν αντίδρασης PCR χωρίς εκκινητές.

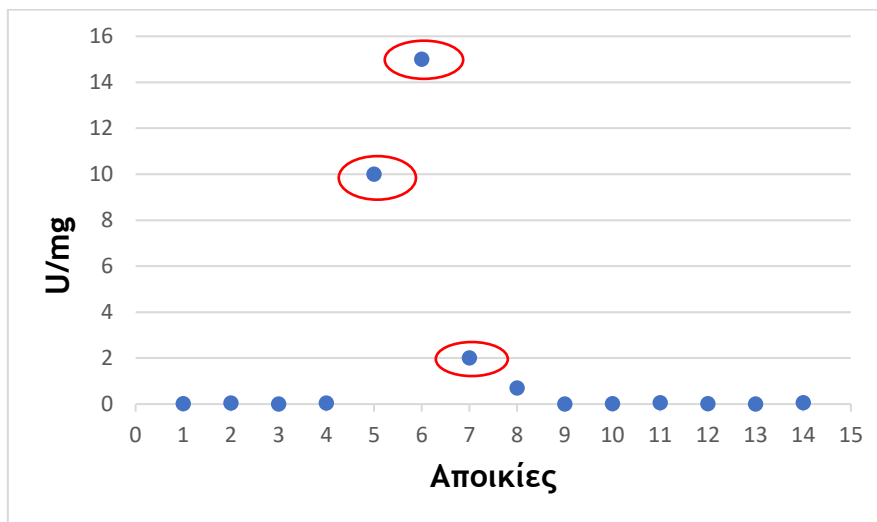
Ακολουθεί PCR με εκκινητές, εκλεκτικούς για το γονίδιο *GmGSTU4-4* (Εικόνα 3.36), ώστε να ενισχυθούν πλήρους μήκους γονίδια. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pETite C-His vector και ακολούθησε μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων HI-Control BL21 (DE3) παρουσία αντιβιοτικού (καναμυκίνη), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην § 2.2.24.



Εικόνα 3.36: PCR με χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο *GmGSTU4-4*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

3.3.11 Σάρωση βιβλιοθήκης τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

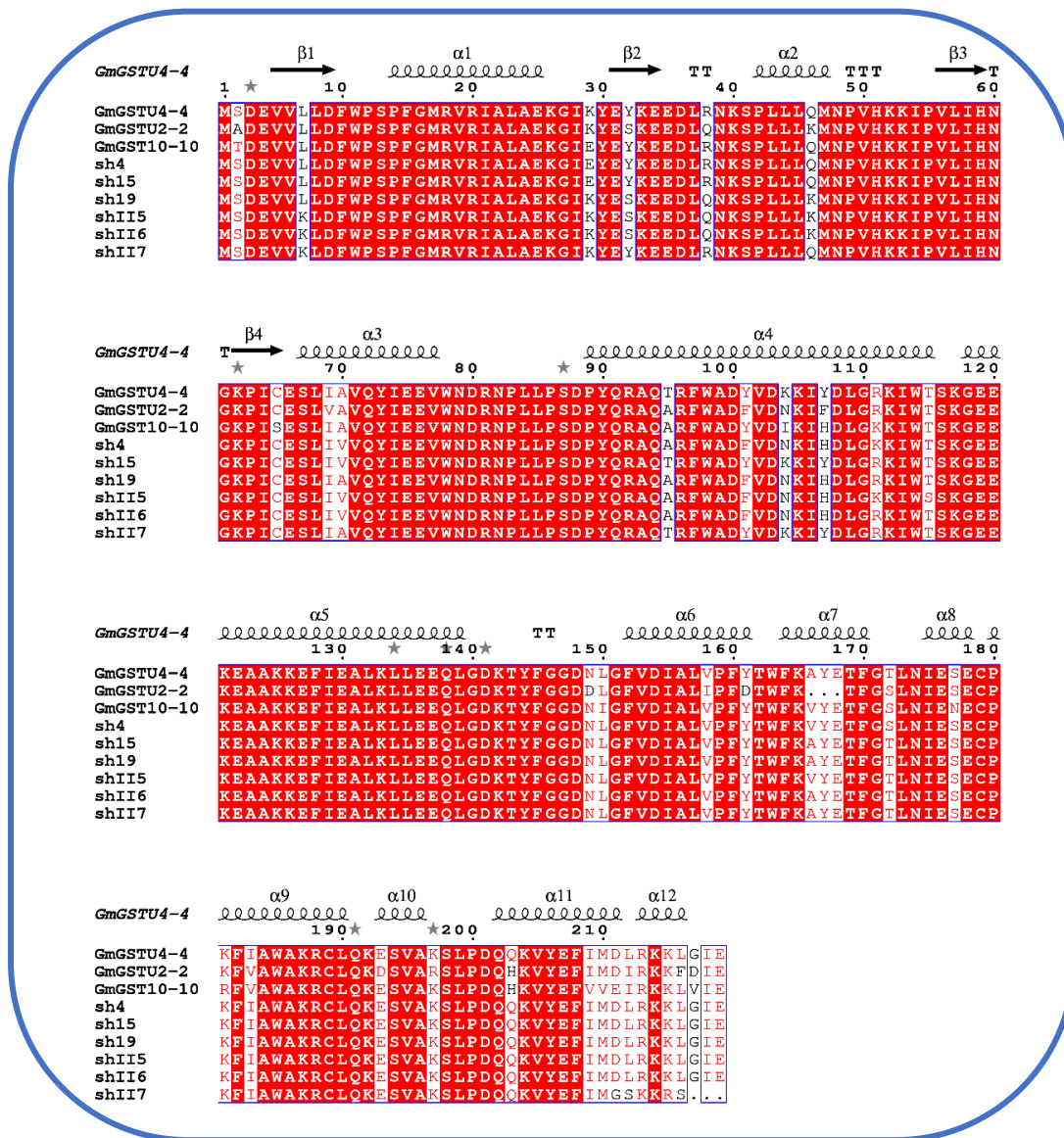
Πραγματοποιήθηκε σάρωση 14 αποικιών και προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα με το σύστημα GSH/CDNB (Σχήμα 3.6). Μόνο πέντε από τις δεκατέσσερις αποικίες εμφάνισαν ενζυμική δραστηριότητα με το σύστημα GSH/CDNB ενώ οι υπόλοιπες μηδενική ή σχεδόν μηδενική. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν περαιτέρω είναι οι shII5, shII6 και shII7. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA και υποβλήθηκε σε αλληλούχιση. Αναζήτηση της ομολογίας με το πρόγραμμα Blastp έδειξε ότι οι μορφές εμφάνιζαν υψηλή ομολογία με το ένζυμο *GmGSTU4-4* ([NP_001237713.2](#)). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η διασπορά της ενζυμικής δραστηριότητας των αποικιών μετά τον τρίτο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Διαγραμματική απεικόνιση της ενζυμικής δραστηριότητας των αποικιών μετά τον τρίτο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης. Επισημαίνονται οι αποικίες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση των ισοενζύμων shII5, shII6, shII7 με τα καλύτερα ισοένζυμα από τη δεύτερη διαδικασία ενζυμικής κατευθυνόμενης εξέλιξης (sh4, sh15 και sh19) καθώς και με τις πατρικές αλληλουχίες (*GmGSTU4-4*, *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*). Το ισοένζυμο shII5 διαφέρει από το sh4 κατά 7 αμινοξέα, από το sh15 κατά 12 αμινοξέα και από το sh19 κατά 5 αμινοξέα. Το ισοένζυμο shII6 διαφέρει από το sh4 κατά 8 αμινοξέα, από το sh15 κατά 9 αμινοξέα και από το sh19, μόλις, κατά 2 αμινοξέα. Τέλος, το ισοένζυμο shII7 διαφέρει από το sh4 κατά 15 αμινοξέα, από το sh15 κατά 8 αμινοξέα και από το sh19 κατά 13 αμινοξέα (Εικόνα 3.37). Οι διαφορές μεταξύ των ισοενζύμων μπορεί να είναι

μικρές αλλά είναι ικανές να διαφοροποιήσουν τις δομικές και καταλυτικές ιδιότητές τους.



Εικόνα 3.37: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών, μέσω του προγράμματος ClustalW, των ισοενζύμων sh4, sh15, sh19, shII5, shII6, shII7 και *GmGSTU4-4* (Clustal W, Thompson *et al.*, 1994).

Επίσης, στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο των ισοενζύμων καθώς και το θεωρητικό μοριακό τους βάρος (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9: Θεωρητικός υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου και μοριακού βάρους με τη χρήση του EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/)

Ένζυμο	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
shII5	6,36	25.443,50
shII6	6,36	25.457,49
shII7	8,25	25.210,15

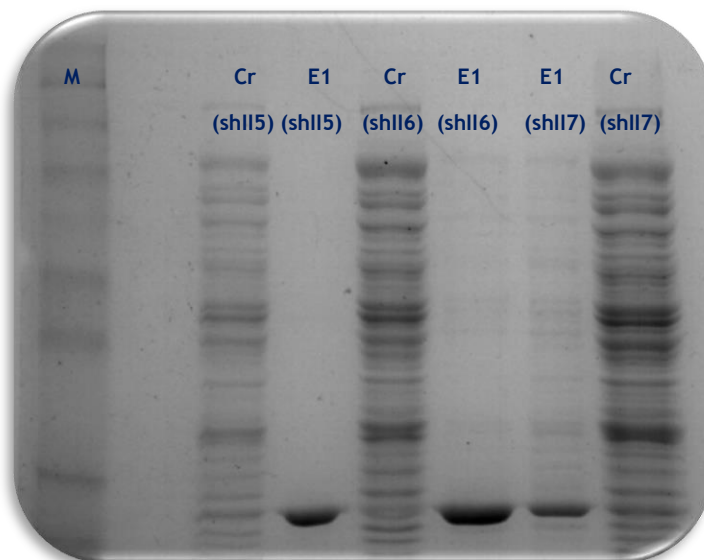
3.3.12 Έκφραση και καθαρισμός GST ισοενζύμων του τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των ισοενζύμων που προέκυψαν από την κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη. Ακολούθησε μετασηματισμός των κυττάρων *E. coli* HI Control BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (§ 2.2.3). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C με θρεπτικό μέσο λακτόζης για 24 h, έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη (30 mg/mL). Μετά το πέρας, των 24 h κατάλληλη ποσότητα κυττάρων λύεται με τη βοήθεια υπερήχων και το βιολογικό εκχύλισμα που προκύπτει, μετά τη φυγοκέντρηση, φορτώνεται σε κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας (§ 2.2.13). Τα ισοένζυμα shII5, shII6 και shII7, καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 86,9 %, 94 % και 47,5 % αντίστοιχα (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10: Απόδοση καθαρισμού (%) της χρωματογραφίας συγγένειας.

Ένζυμο	Απόδοση καθαρισμού (%)
shII5	86,9
shII6	94
shII7	47,5

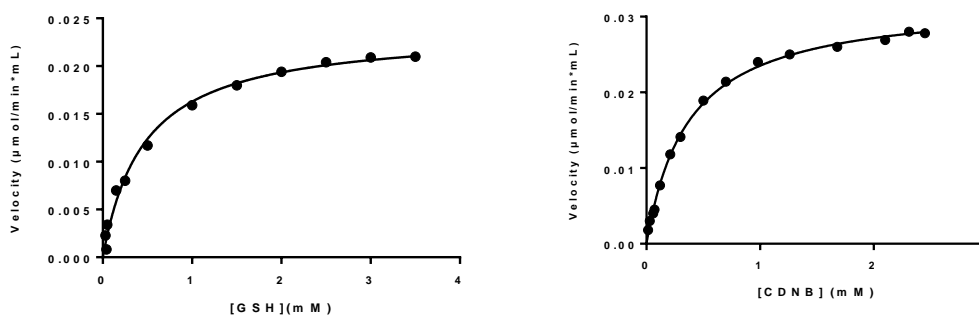
Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η καθαρότητα τους (Εικόνα 3.38).



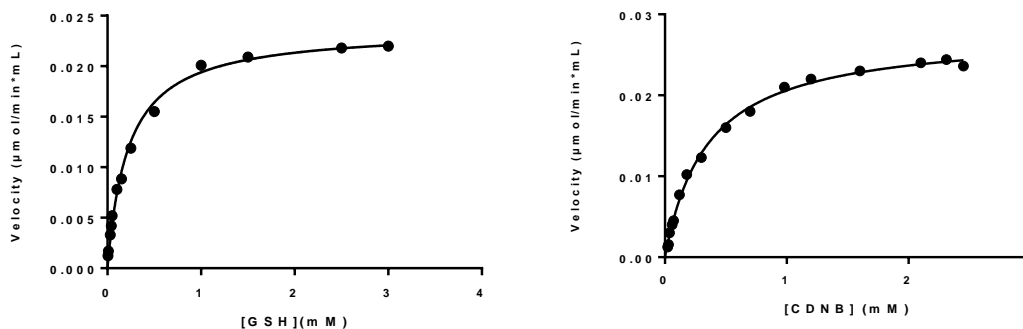
Εικόνα 3.38: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (15 % w/v) παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), Cr(shII5): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) του shII5, E1(shII5): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το shII5, Cr(shII6): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) του shII6, E1(shII6): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το shII6, Cr(shII7): πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) το shII7, E1(shII7): ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το shII7.

3.3.13 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών του τρίτου κύκλου κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης για το σύστημα GSH/CDNB

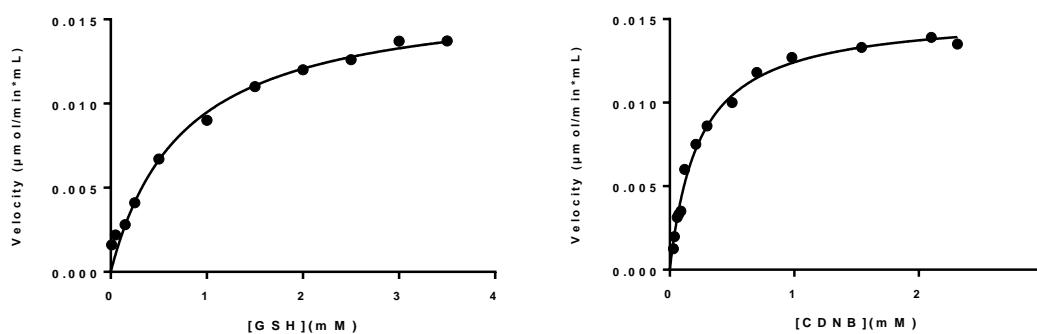
Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για τα υποστρώματα GSH και CDNB. Όπως φαίνεται από τις γραφικές παραστάσεις τα ισοένζυμα ακολουθούν κινητική *Michaelis Menten* (Εικόνα 3.39-3.41).



Εικόνα 3.39: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο shII5.



Εικόνα 3.40: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο shII6.



Εικόνα 3.41: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο shII7.

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας με τις σταθερές K_m και k_{cat} για τα για τα τρία ισοένζυμα (shII5, shII6, shII7) (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11: Κινητικές σταθερές για τα ισοένζυμα shII5, shII6 και shII7 για το σύστημα CDNB/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	shII5		shII6		shII7	
	CDNB	GSH	CDNB	GSH	CDNB	GSH
K_m (mM)	$0,37 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,12$
k_{cat} (min^{-1})	1100 ± 223		$79,5 \pm 11,5$		$415 \pm 67,5$	

3.3.14 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων του τρίτου κύκλου της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης

Στα ισοένζυμα που προέκυψαν από τη διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης, όπως και ο άγριος τύπος, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα έναντι ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων για να διαπιστωθεί εάν εμφανίζουν και άλλες δράσεις όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή δράση αναγωγής και θειολοτρανσφεράσης.

Αναλυτικότερα, τα ισοένζυμα shII5, shII6 και shII7, που παρουσιάζονται στον Πίνακα παρακάτω, φαίνεται να εμφανίζουν μια σχετικά περιορισμένη εκλεκτικότητα, όσον αφορά στα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα, σε σχέση με τα ισοένζυμα του δεύτερου κύκλου της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Τα τρία ισοένζυμα, καταλύουν δέκα από τα δεκαοχτώ υποστρώματα.

Τα shII5, shII6 και shII7 παρουσιάζουν σχεδόν παρόμοια συμπεριφορά. Από τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του, 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα εκτός από το IDNB και το pNBC (Πίνακα 3.12). Επίσης, τα shII5, shII6 και shII7 εμφανίζουν αξιοσημείωτη ειδική δραστηριότητα έναντι των FDNB και BDNB σε σχέση με τα υπόλοιπα παράγωγα του νιτροβενζολίου. Ειδικότερα τα shII5 και shII6 εμφανίζουν περίπου 2,5-φορές υψηλότερη ειδική δραστηριότητα με το FDNB σε σχέση με το CDBN, που αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα για τις GSTs, ενώ το shII7 πάνω από 3,5-φορές. Όσο αναφορά στο BDNB και τα τρία ισοένζυμα εμφανίζουν περίπου διπλάσια ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το CDBN.

Επίσης, και τα τρία ισοένζυμα εξετάστηκαν ως προς τη δράση υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας τα υδροϋπεροξειδίου του κουμηνίου, τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου, ως πιθανά υποστρώματα. Άξιο λόγου είναι η αρκετά αυξημένη ειδική δραστηριότητα που παρουσιάζουν και τα τρία ισοένζυμα με το τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίου, που φτάνει περίπου στα ίδια επίπεδα με το FDNB. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξειδία, μετατρέποντάς τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Chen *et al.*, 2017). Τα υδροϋπεροξειδία σχηματίζονται από την οξειδωτική βλάβη των μεμβρανικών λιπαρών οξέων (Attacha *et al.*, 2017). Τα μέλη της *tau* τάξης εμφανίζουν υψηλή δράση υπεροξειδάσης, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων (Dixon *et al.*, 2009, 2011). Μόνο το shII5 φαίνεται να παρουσιάζει καταλυτική δράση με CuOOH ενώ με το tert-Butyl hydroperoxide μόνο με το shII7 (Πίνακας 3.12).

Επιπλέον, το fluorodifen, η trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη, η βρωμοσουλφοφθαλεΐνη, ο ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας και η 2-2 διθειοδιαιθανόλη δεν αποτελούν υπόστρωμα για κανένα από τα παραπάνω ισοένζυμα. Όμως, για τα shII5, shII6 και shII7 το αιθακρινικό οξύ καθώς και ο ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας φαίνεται να εμφανίζουν σχετικά χαμηλή ειδική δραστηριότητα. Τέλος, το διϋδροασκορβικό οξύ αποτέλεσε υπόστρωμα μόνο για το shII6 ενώ η trans-2-ενεάλη μόνο για το shII6.

Στον παρακάτω Πίνακα εμφανίζεται η *ειδική δραστηριότητα (%)* την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα shII5, shII6 και shII7 έναντι των διαφορετικών υποστρωμάτων (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.12: Ειδική δραστηριότητα (%) των ισοενζύμων shII5, shII6, shII7, ως προς διαφορετικά ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστηριότητα που εμφάνισαν τα ισοένζυμα έναντι του CDNB.

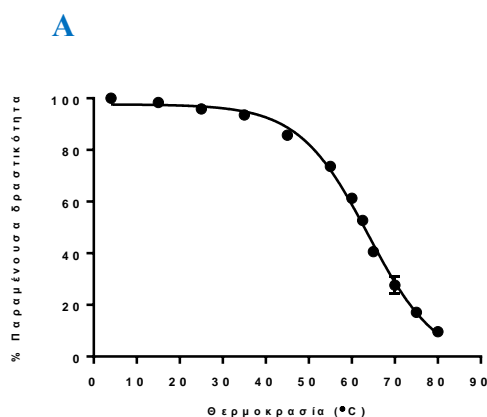
Υπόστρωμα	shII5	shII6	shII7
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο	100	100	100
1-φθορο-2,4δινιτροβενζόλιο	151,5	195,7	250
1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο	8,15	0	0
π-νιτροβενζυλγλωρίδιο	0	0	0
4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο	72,6	108,5	80
Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου	25,2	0	0
τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο	0	0	5
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	150,4	192,5	37,7
διϋδροασκορβικό οξύ	0	7,4	0
trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη	0	0	0
Fluorodifen	0	0	0
Αιθακρινικό οξύ	11,1	6,4	5

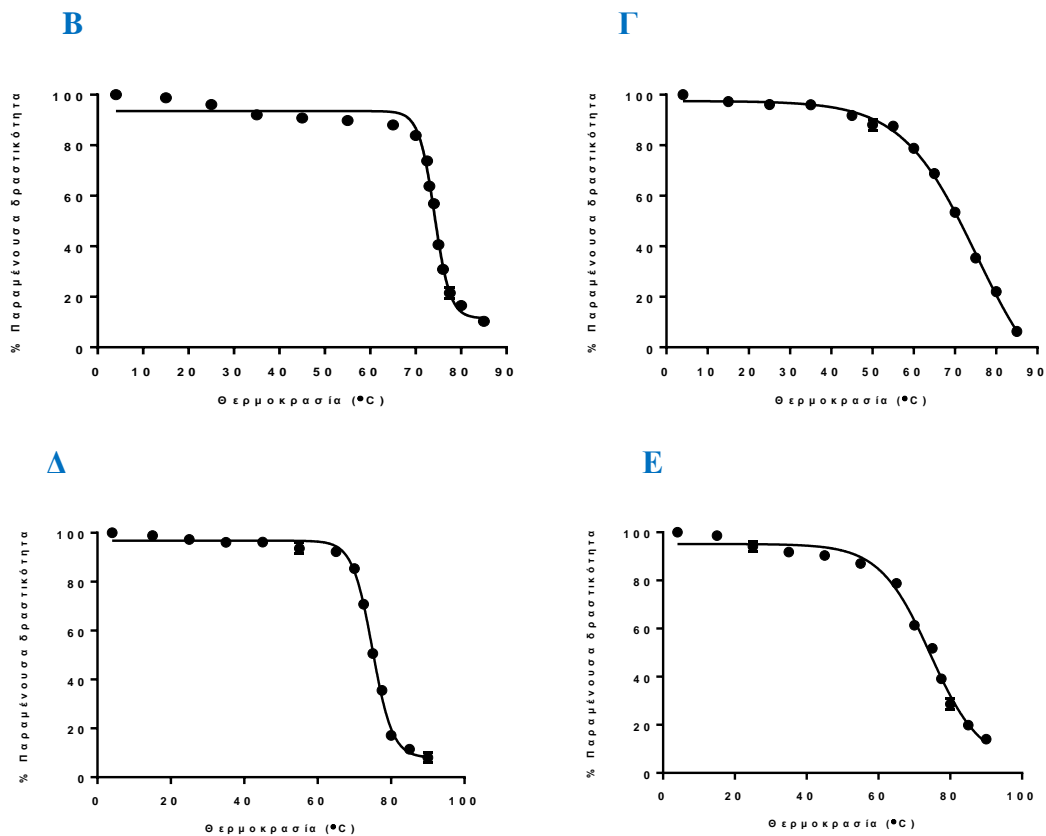
ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας	0	0	0
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας	14,8	20,2	10
2-2διθειοδιαιθανόλη	0	0	0
trans-2-ενενάλη	8,15	0	0
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη	0	0	0

3.3.15 Θερμική σταθερότητα GST ισοενζύμων

Μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των ισοενζύμων *GmGSTU4-4*, sh4, shII5, shII6 και shII7 σε ένα εύρος θερμοκρασιών που κυμαίνονταν από τους 4-90 °C. Το σημείο τήξεως (T_m) ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται στο μισό (50 %). Για τη μελέτη αυτή, καθαρίστηκαν τα ένζυμα με χρωματογραφία συγγένειας και στη συνέχεια επωάστηκαν σε κάθε θερμοκρασία για 5 min. Η δραστηριότητα στους 4 °C θεωρήθηκε ως 100 % ώστε να προσδιοριστεί η υπολειπόμενη δραστηριότητα για τις άλλες θερμοκρασίες. Η δραστηριότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με το σύστημα CDNB/GSH (Εικόνα 3.42).

Όπως παρατηρούμε και στον Πίνακα που ακολουθεί το *GmGSTU4-4* παρουσιάζει σημείο τήξεως στους 66,3 °C, περίπου δέκα βαθμούς χαμηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Υψηλότερο σημείο τήξεως εμφανίζει το sh4 με 75,1 °C (Πίνακας 3.13).





Εικόνα 3.42: Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης των ενζύμων (Α) *GmGSTU4-4*, (Β) *sh4*, (Γ) *shII5*, (Δ) *shII6* και (Ε) *shII7*.

Πίνακας 3.13: Σημείο τήξεως (T_m) ισοενζύμων.

Ένζυμο	T_m (°C)
<i>GmGSTU4-4</i>	$66,3 \pm 0,4$
<i>sh4</i>	$75,1 \pm 0,3$
<i>shII5</i>	$73,6 \pm 0,5$
<i>shII6</i>	$74,8 \pm 0,2$
<i>shII7</i>	$74,3 \pm 1,9$

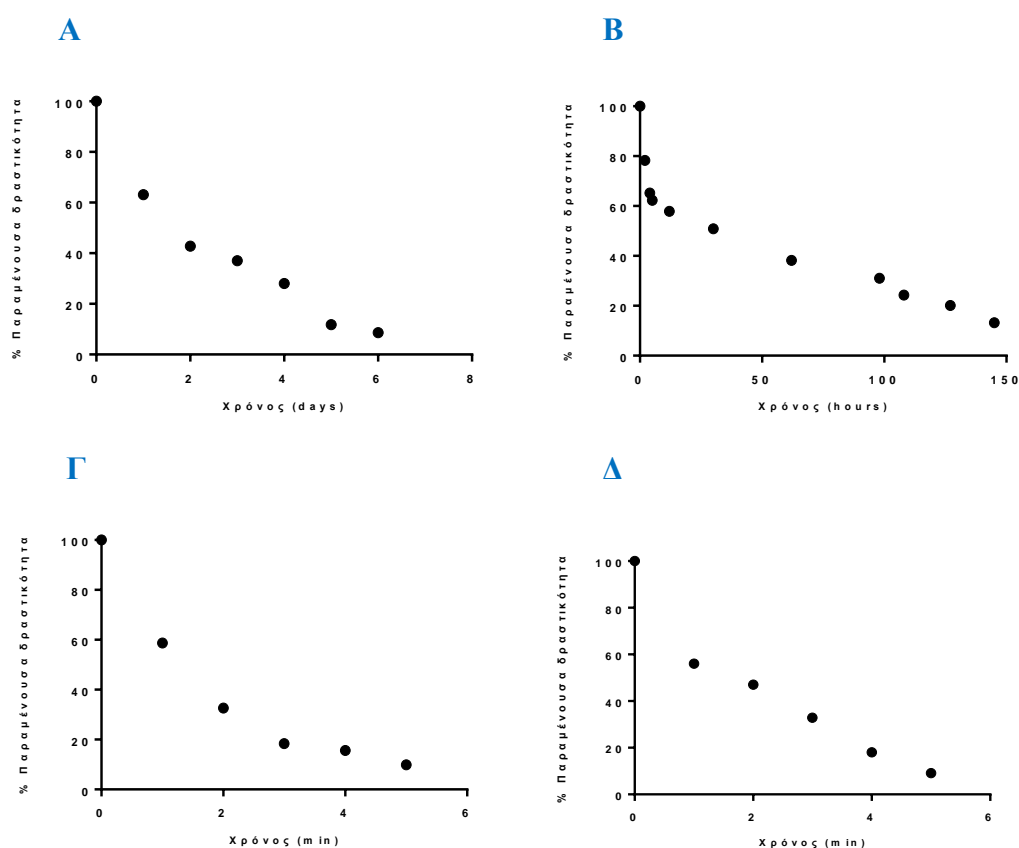
3.3.16 Κινητική ανάλυση της δομικής σταθερότητας

Μελετήθηκε η δομική σταθερότητα των ισοενζύμων *GmGSTU4-4*, *sh4*, *shII5*, *shII6* και *shII7*. Από τα δεδομένα που προέκυψαν υπολογίστηκε η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH^\ddagger) καθώς και της εντροπίας (ΔS^\ddagger) μέσω των εξισώσεων 3.1 και 3.2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.14. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η πορεία αδρανοποίησης των ισοενζύμων (*GmGSTU4-4*,

sh4, shII6, shII5, shII7) σε κάθε θερμοκρασία (50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C) σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το ισοένζυμο GmGSTU4-4

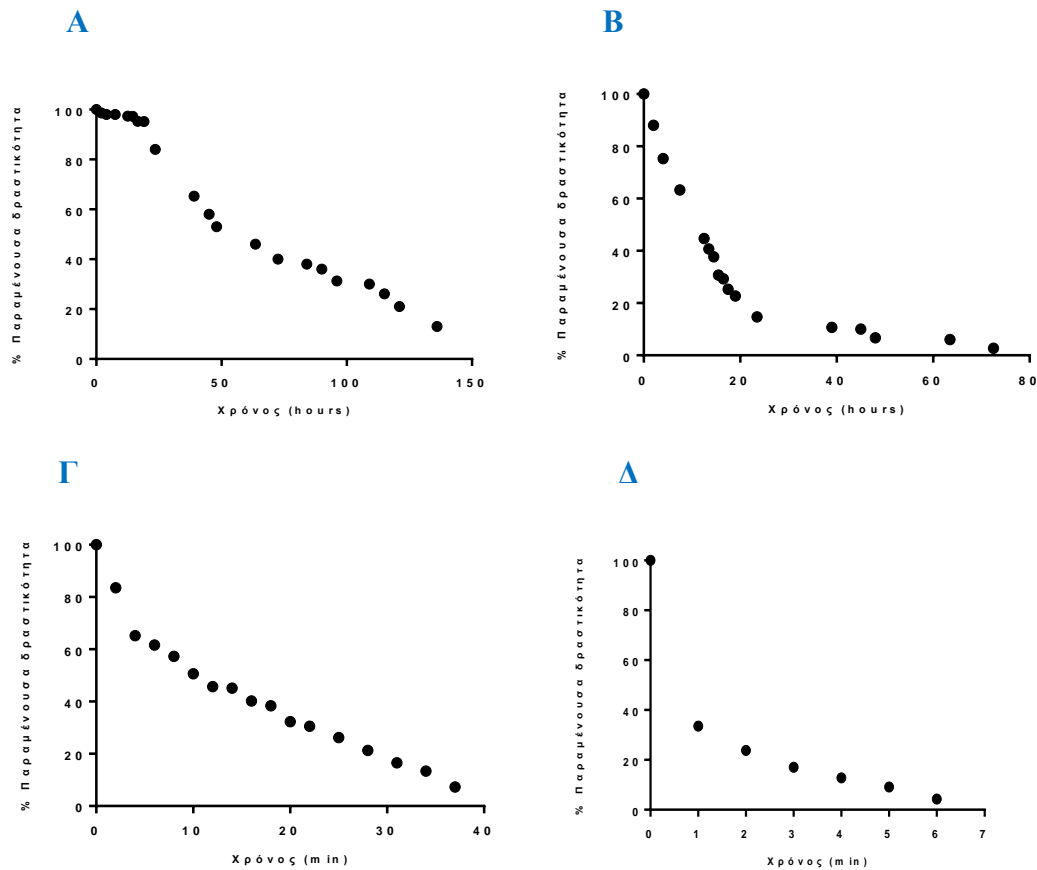
Μελετήθηκαν τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C). Όπως παρατηρείται από τα παρακάτω διαγράμματα το ένζυμο διατηρεί τη λειτουργική σταθερότητά του πάνω από 9 h στους 50 °C ενώ περίπου 50 min στους 60 °C. Επιπλέον, στις υψηλότερες θερμοκρασίες, στους 70 °C και στους 80 °C παρουσιάζει ελάχιστη ανοχή, δηλαδή φαίνεται να παραμένει λειτουργικό 4-5 min (Εικόνα 3.43).



Εικόνα 3.43: Πορεία αδρανοποίησης του *GmGSTU4-4* στους (Α) 50 °C, (Β) 60 °C, (Γ) 70 °C και (Δ) 80 °C σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το ισοένζυμο sh4

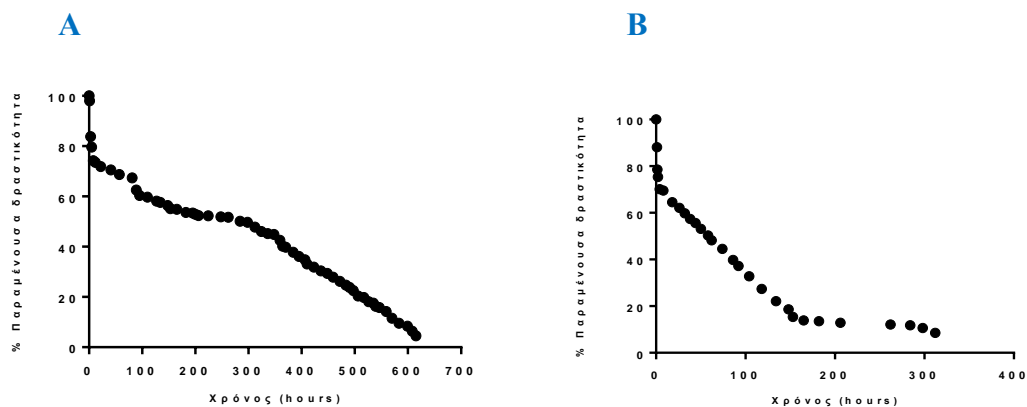
Μελετήθηκε η δομική σταθερότητα του ισοενζύμου sh4. Αναλυτικότερα, το sh4 παρέμεινε λειτουργικά σταθερό περίπου 6 d στους 50 °C, 70 h στους 60 °C και 35 h στους 70 °C. Όμως, στους 80 °C η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται περίπου στο 60 % μέσα σε ένα λεπτό και αδρανοποιείται εντελώς σε 6 min (Εικόνα 3.44).

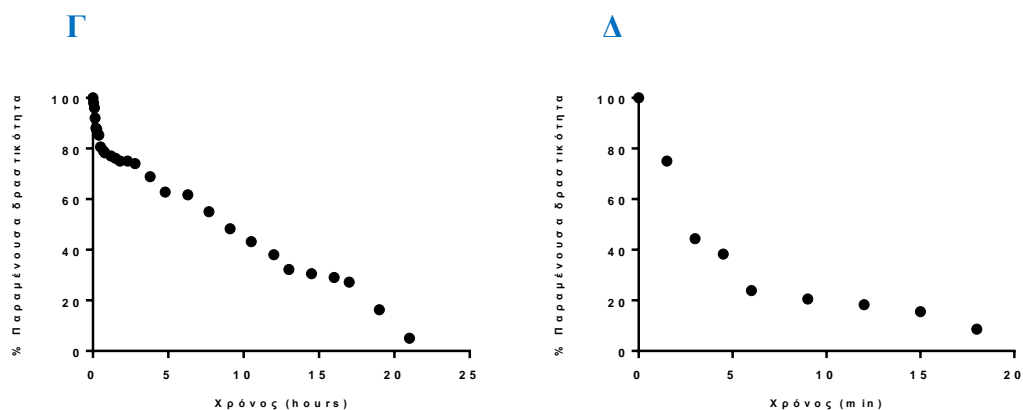


Εικόνα 3.44: Πορεία αδρανοποίησης του ισοενζύμου sh4 στους (Α) 50 °C, (Β) 60 °C, (Γ) 70 °C και (Δ) 80 °C σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το ένζυμο shII5

Το ισοένζυμο shII5 διατήρησε τη δομική και καταλυτική λειτουργικότητά του περισσότερο από έξι μήνες στους 50 °C ενώ παρέμεινε λειτουργικά σταθερό δεκατρείς ημέρες στους 60 °C. Επιπρόσθετα, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, παρατηρούμε μια ασυνήθιστη συμπεριφορά για τις GSTs, όπου στους 70 °C η δραστηκότητα διατηρείται περίπου 24 h ενώ στους 80 °C το ένζυμο παραμένει λειτουργικό για περίπου 18 min (Εικόνα 3.45).

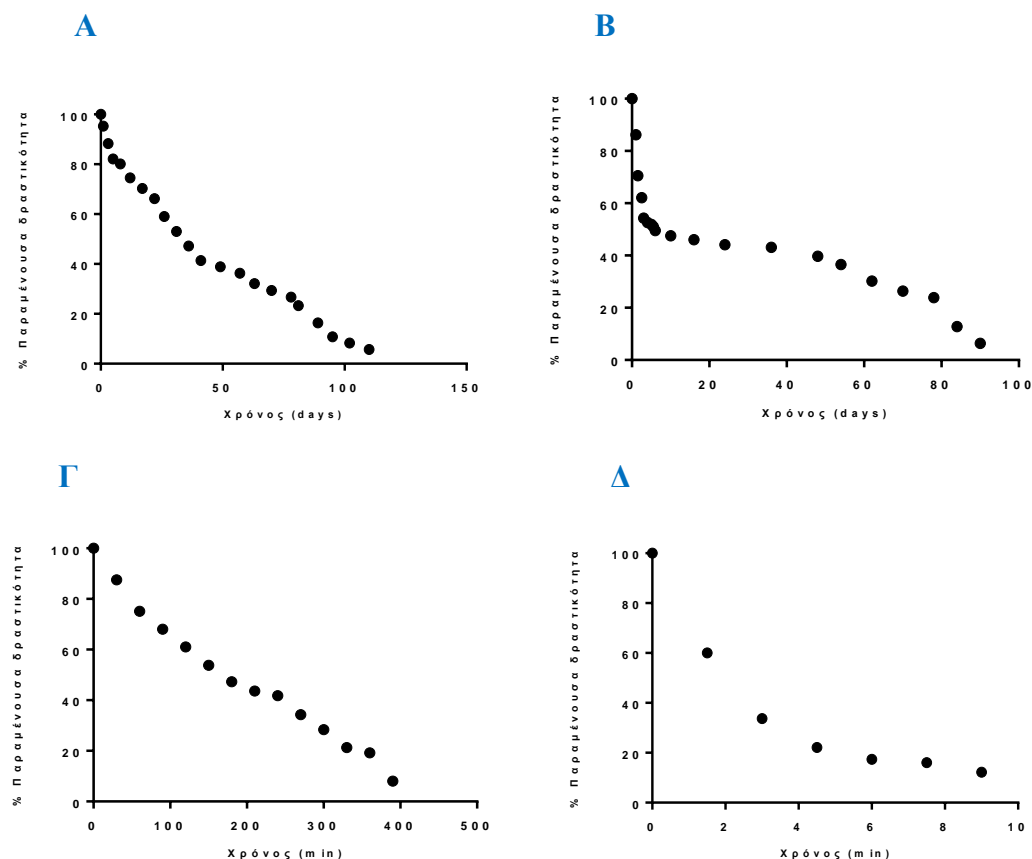




Εικόνα 3.45: Πορεία αδρανοποίησης του ισοενζύμου shII5 στους (Α) 50 °C, (Β) 60 °C, (Γ) 70 °C και (Δ) 80 °C σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το ισοένζυμο shII6

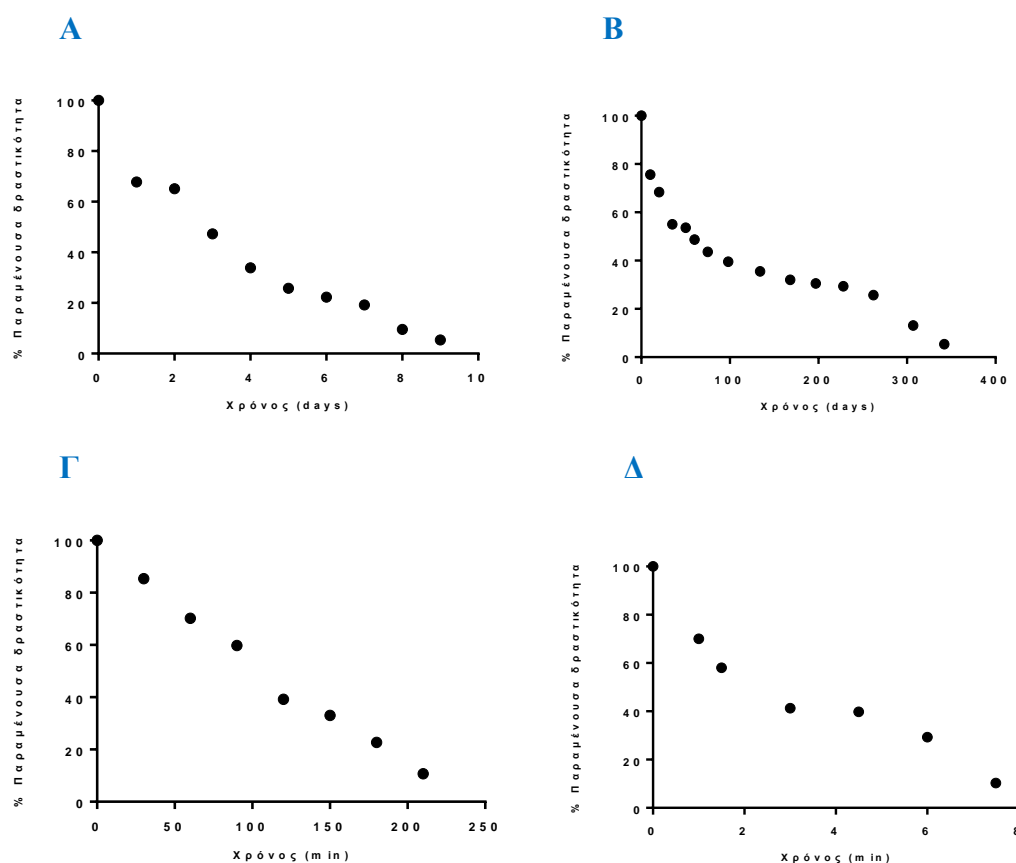
Το ισοένζυμο shII6 μελετήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως παρατηρείται στα παρακάτω διαγράμματα το shII6 διατηρεί τη λειτουργική σταθερότητά του πάνω από 3,5 μήνες στους 50 °C ενώ περίπου τέσσερις μέρες στους 60 °C. Παράλληλα, στις υψηλότερες θερμοκρασίες φαίνεται να εμφανίζει ενζυμική δραστηκότητα περίπου για 7 h στους 70 °C και μόλις 9 min στους 80 °C (Εικόνα 3.46).



Εικόνα 3.46: Πορεία αδρανοποίησης του ισοενζύμου shII6 στους (Α) 50 °C, (Β) 60 °C, (Γ) 70 °C και (Δ) 80 °C σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το ισοένζυμο shII7

Τέλος, η ίδια ακριβώς μελέτη πραγματοποιήθηκε και για το ισοένζυμο shII7, το οποίο παρέμεινε λειτουργικά σταθερό περίπου δεκαπέντε ημέρες στους 50 °C ενώ στους 60 °C μόνο εννιά. Όσο αναφορά στους 70 °C, το shII7 διατήρησε την ενζυμική δραστηριότητά του περίπου 3,5 h. Τέλος, στους 80 °C η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται σταδιακά και αδρανοποιείται εντελώς σε 7 περίπου λεπτά (Εικόνα 3.47).



Εικόνα 3.47: Πορεία αδρανοποίησης του ισοενζύμου shII7 στους (Α) 50 °C, (Β) 60 °C, (Γ) 70 °C και (Δ) 80 °C σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius (3.1) και Eyring (3.2). Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης, της μεταβολής της ενθαλπίας και της μεταβολής της εντροπίας για τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, sh4, shII5, shII6 και shII7 σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Πίνακας 3.15). Η ΔH^\ddagger είναι η διαφορά της ενθαλπίας μεταξύ της μεταβατικής κατάστασης της αντίδρασης και της θεμελιώδους κατάστασης των αντιδρώντων. Παρατηρούμε πως η ΔH^\ddagger παρουσιάζεται θετική για όλα τα ισοένζυμα, το οποίο αναμενόταν, επειδή η μεταβατική κατάσταση περιλαμβάνει σπάσιμο των δεσμών

(Heitz, 2017). Η μεταβολή της ενθαλπίας φαίνεται να είναι χαμηλότερη στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες σε σχέση με τις μικρότερες. Η ΔS^\ddagger δηλώνει την αταξία του συστήματος. Παρουσιάστηκε αρνητική, δείχνοντας πως η δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης απαιτεί τα αντιδρώντα μόρια να είναι πιο κοντά το ένα με το άλλο στο ενεργό σύμπλοκο (Shi *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2016). Η Εα αποτελεί το ενεργειακό «φράγμα» το οποίο πρέπει να υπερνικηθεί για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Παρατηρείται πως η ενέργεια ενεργοποίησης για τις μικρότερες θερμοκρασίες είναι υψηλότερη σε σχέση με τις μεγαλύτερες.

Πίνακας 3.15: Ενέργεια ενεργοποίησης, μεταβολή της ενθαλπίας και μεταβολή της εντροπίας της αντίδρασης των ενζύμων *GmGSTU4-4*, sh4, shII5, shII6 και shII7 για κάθε θερμοκρασία. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius (3.1) και Eyring (3.2).

Ένζυμο	Θερμοκρασία (°C)	Εα (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (kJ/mol·K)
<i>GmGSTU4-4</i>	80	7,807	5,537	-0,186
	70	11,585	9,315	-0,172
	60	16,989	14,719	-0,152
	50	23,330	21,060	-0,129
sh4	80	11,040	8,770	-0,174
	70	15,890	12,819	-0,153
	60	17,477	15,207	-0,148
	50	20,486	18,216	-0,140
shII5	80	14,072	11,802	-0,163
	70	16,046	13,776	-0,155
	60	20,654	18,384	-0,138
	50	27,976	25,706	-0,112
shII6	80	13,073	10,803	-0,167
	70	22,810	20,540	-0,131
	60	24,251	22,694	-0,126
	50	26,328	24,058	-0,117
shII7	80	13,527	11,257	-0,167
	70	21,539	19,269	-0,153
	60	21,516	19,246	-0,145
	50	20,699	18,429	-0,138

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης, της μεταβολής της ενθαλπίας και της μεταβολής της εντροπίας για τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, sh4, shII5, shII6 και shII7 (Πίνακας 3.16). Παρατηρούμε πως το *GmGSTU4-4* εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές όσο αναφορά στην ενέργεια ενεργοποίησης και στη μεταβολή της ενθαλπίας σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Η ενέργεια ενεργοποίησης και η μεταβολή της ενθαλπίας για τα shII5 και shII6 κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα ενώ για το shII7 εμφανίζονται να είναι λίγο χαμηλότερες. Τέλος, το sh4 φαίνεται να έχει τις χαμηλότερες τιμές όσο αναφορά στα δυο αυτά μεγέθη (Πίνακας 3.16). Η μεταβολή της εντροπίας εμφανίζεται μεγαλύτερη για τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4* και sh4 ενώ για το shII5 σημαντικά μικρότερη.

Πίνακας 3.16: Ενέργεια ενεργοποίησης, μεταβολή της ενθαλπίας και μεταβολή της εντροπίας της αντίδρασης των ενζύμων *GmGSTU4-4*, sh4, shII5, shII6 και shII7. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius (3.1) και Eyring (3.2).

Ένζυμο	Ea (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (kJ/mol·K)
<i>GmGSTU4-4</i>	11,936	9,666	-0,218
sh4	7,171	4,901	-0,198
shII5	10,254	7,989	-0,120
shII6	10,073	7,803	-0,170
shII7	9,061	6,791	-0,168

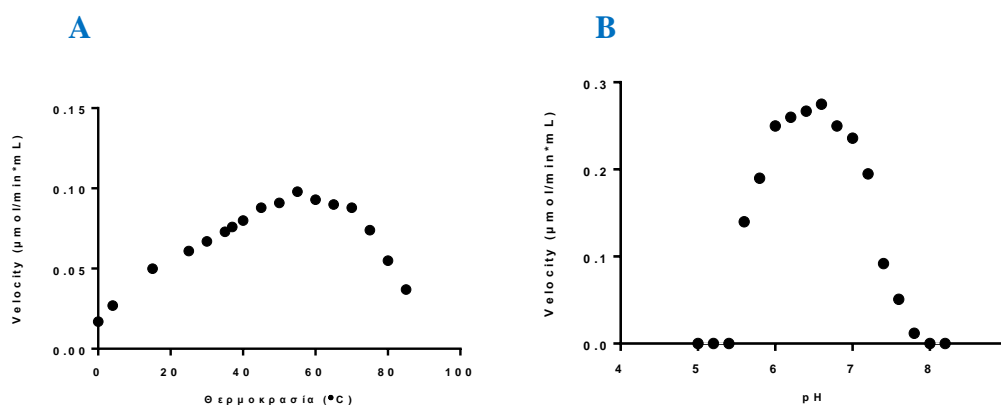
3.3.17 Επίδραση θερμοκρασίας και pH στην ενζυμική δραστηριότητα

Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Αυτό οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες καθώς επηρεάζουν την σταθερότητα και στερεοδομή του ενζύμου, τη διαλυτότητα των αντιδρώντων, τη συγγένεια αδρανοποιητών και ενεργοποιητών με το ένζυμο, την ιοντική ισχύ, τη διηλεκτρική σταθερά, τη στερεοδιάταξη του ενζύμου καθώς και τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα και με άλλα μόρια (Jaenicke, 2000; Kumar and Nussinov, 2001).

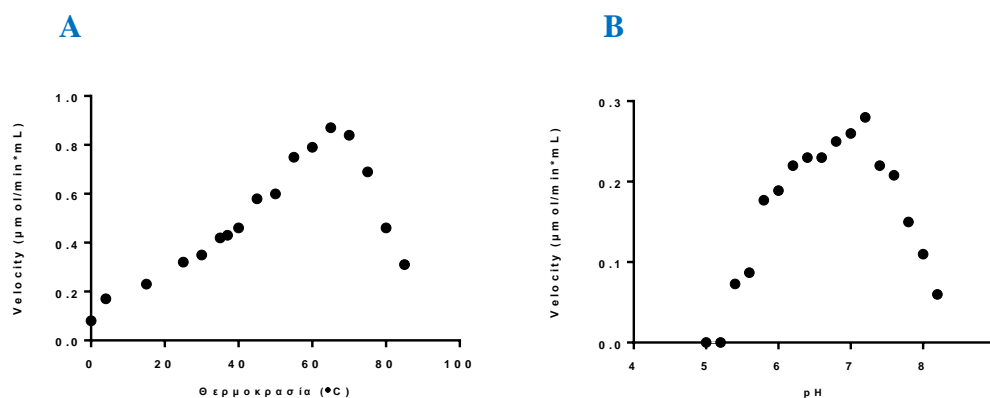
Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης έναντι της θερμοκρασίας εκτιμήθηκε με το σύστημα CDNB/GSH σε θερμοκρασιακό εύρος το οποίο κυμανθήκαμε από 0 - 90 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από το pH εκτιμήθηκε με το σύστημα CDNB/GSH σε εύρος pH 5-5,8 με ρυθμιστικό

διάλυμα άνυδρου κιτρικού οξέος 0,1 M και όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M, ενώ σε εύρος pH 6-8 με ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M και δισόξινου φωσφορικού νατρίου 0,2 mM.

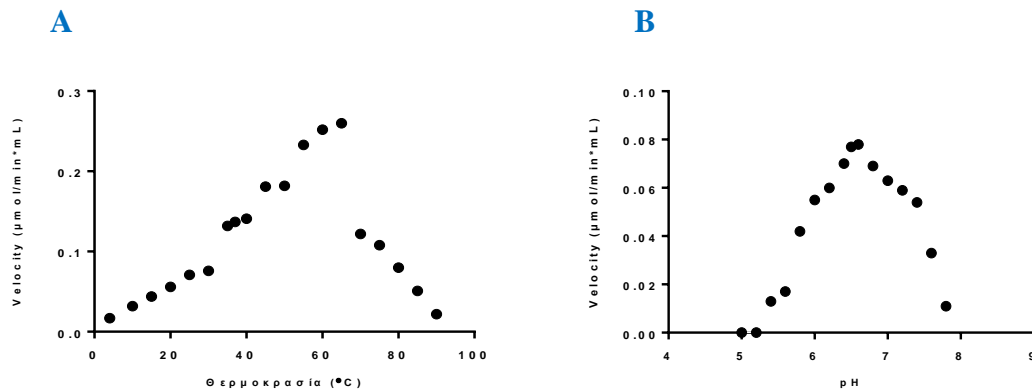
Ειδικότερα, το shII5 φαίνεται να εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία τους 55 °C ενώ τα shII6 και shII7, δέκα βαθμούς υψηλότερη, στους 65 °C. Και τα τρία ισοένζυμα έχουν βέλτιστη θερμοκρασία πέραν των αναμενόμενων ορίων για τις GSTs. Όσον αφορά στο pH το shII5 και το shII7 εμφανίζει βέλτιστο pH στο 6,6 ενώ το shII6 στο 7,2 (Εικόνα 3.48–3.50).



Εικόνα 3.48: Μεταβολή της ενζυμικής ταχύτητας σε συνάρτηση με τη (A) θερμοκρασία και το (B) pH για το ισοένζυμο shII5.

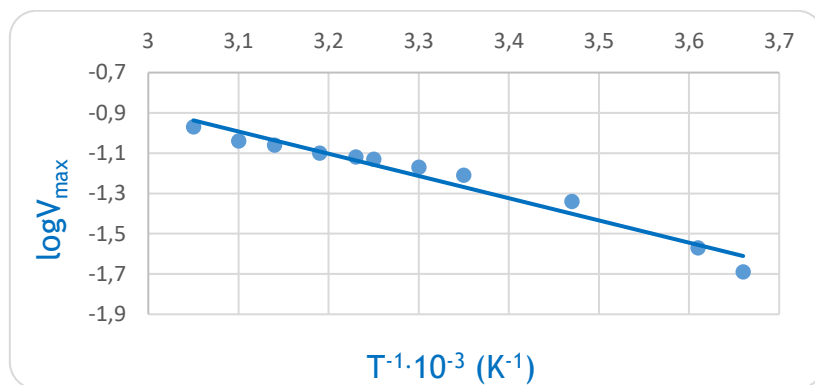


Εικόνα 3.49: Μεταβολή της ενζυμικής ταχύτητας σε συνάρτηση με τη (A) θερμοκρασία και το (B) pH για το ισοένζυμο shII6.

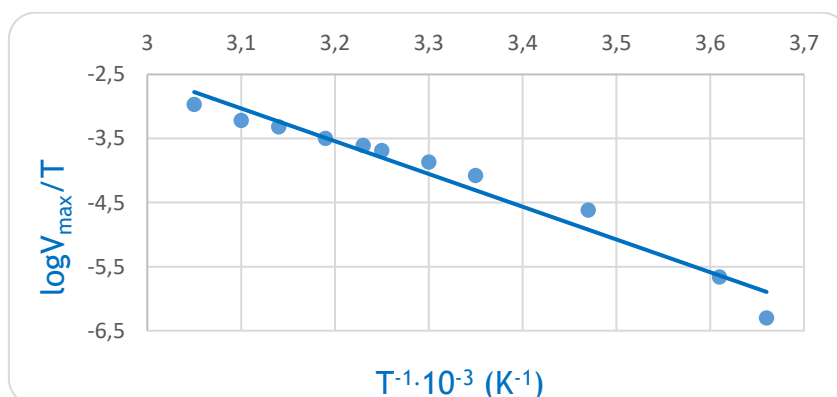


Εικόνα 3.50: Εξάρτηση της ενζυμικής ταχύτητας σε συνάρτηση με τη (Α) θερμοκρασία και το (Β) pH για το ισοένζυμο shII7.

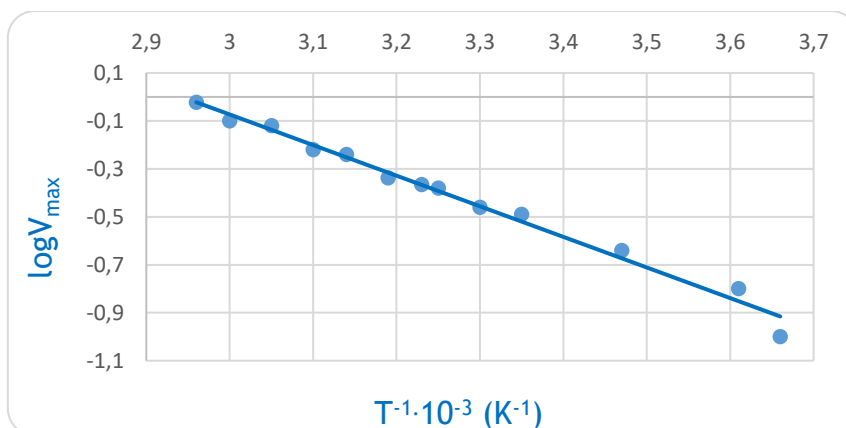
Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι ταχύτητες του ανοδικού τμήματος της βέλτιστης θερμοκρασίας των παραπάνω ισοενζύμων και επεξεργάστηκαν με τις εξισώσεις *Arrhenius* (3.1) και *Eyring* (3.2) (Εικόνα 3.51-3.56). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.17.



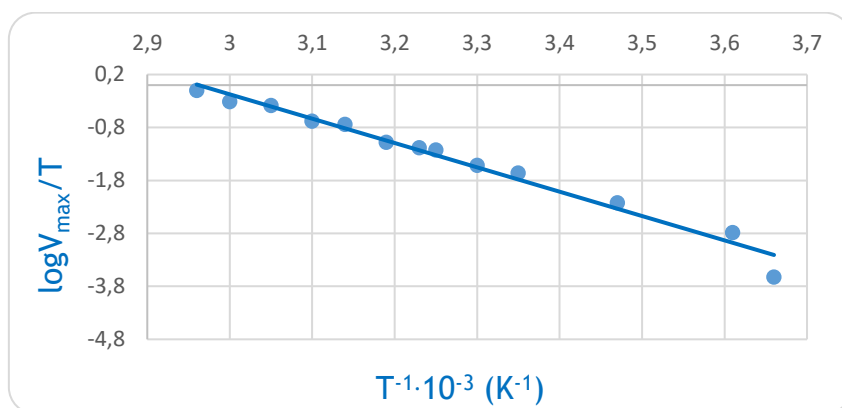
Εικόνα 3.51: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας του ενζύμου shII5 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση *Arrhenius* (Εξίσωση 3.1). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.



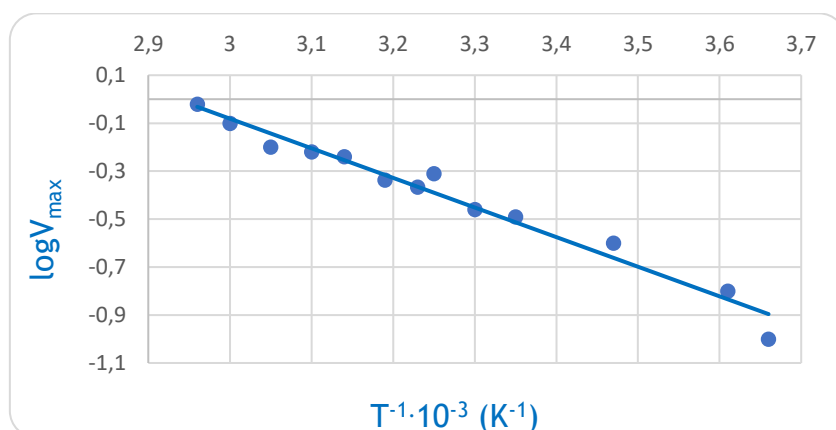
Εικόνα 3.52: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας προς την απόλυτη θερμοκρασία του ενζύμου shII5 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση του *Eyring* (Εξίσωση 3.2). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.



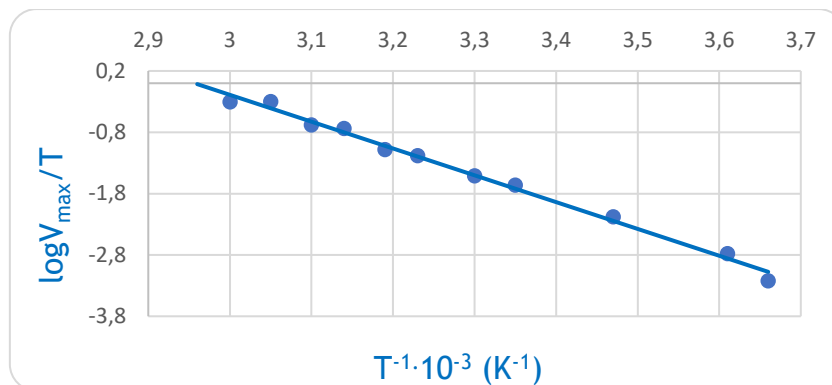
Εικόνα 3.53: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας του ενζύμου shII6 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.1). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.



Εικόνα 3.54: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας προς την απόλυτη θερμοκρασία του ενζύμου shII6 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση του Eyring (Εξίσωση 3.2). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.



Εικόνα 3.55: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας του ενζύμου shII7 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.1). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.



Εικόνα 3.56: Εξάρτηση του λογαρίθμου ταχύτητας προς την απόλυτη θερμοκρασία του ενζύμου shII7 από το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Τα δεδομένα της δραστηρότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση του Eyring (Εξίσωση 3.2). Η ευθεία χαράχθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Πίνακας 3.17: Ενέργεια ενεργοποίησης, μεταβολή της ενθαλπίας και μεταβολή της εντροπίας της αντίδρασης των ενζύμων shII5, shII6 και shII7. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius (3.1) και Eyring (3.2).

Ένζυμο	E_a (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (kJ/mol·K)
shII5	9,584	6,324	-0,169
shII6	12,050	8,023	-0,122
shII7	11,611	7,910	-0,119

3.3.18 Σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου shII5

Αξιολογήθηκαν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ως δυνητικοί αναστολείς του ισοενζύμου shII5. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.37. Στον παρακάτω Πίνακα 3.18 εμφανίζεται η % παραμένουσα δραστηρότητα την οποία παρουσίασε το ισοένζυμο shII5 παρουσία των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Πίνακας 3.18: Παραμένουσα δραστηρότητα (%) του ισοένζυμο shII5 μετά την επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

	Κατηγορία φυτοπροστατευτικού προϊόντος	Όνομασία	Παραμένουσα δραστηριότητα shII5 (%)	
Ζιζανιοκτόνα	Χλωροακεταμίδια	Alachlor	59,25	
		Metolachlor	133,0	
	Τριαζίνες	Atrazine	96,1	
		Terbuthilazine	92,2	
		Diuron	71,1	
		Fluorodifen	77,0	
	Διφαινυλικοί αιθέρες	Desmedipham	81,1	
		Phenmedipham	91,2	
	Εντομοκτόνα	Οργανοχλωριωμένα	Endosulfan	84,7
			α-endosulfan	100,0
β-endosulfan			53,0	
Καρβαμιδικά		Carbaryl	77,7	
		Methomyl	172,0	
		Pirimicarb	87,4	
Οργανοφωσφορικά		Malathion	72,2	
		Fenvalerate	105,0	
Πυρεθροειδή		Permethrin	73,0	
		lambda-cyhalothrin	116,0	
Εστέρες τετρονικού οξέος		Spiromesifen	0	
		Spiroteramat	97,8	
Νεοκοτινοειδή		Clothianidin	87,3	
		Imidacloprid	83,3	
		Thiachloprid	140,0	
Φαινυλακυλουρίες		Diflubenzuron	60,0	
		Triflumuron	61,9	
			Boscalid	78,9

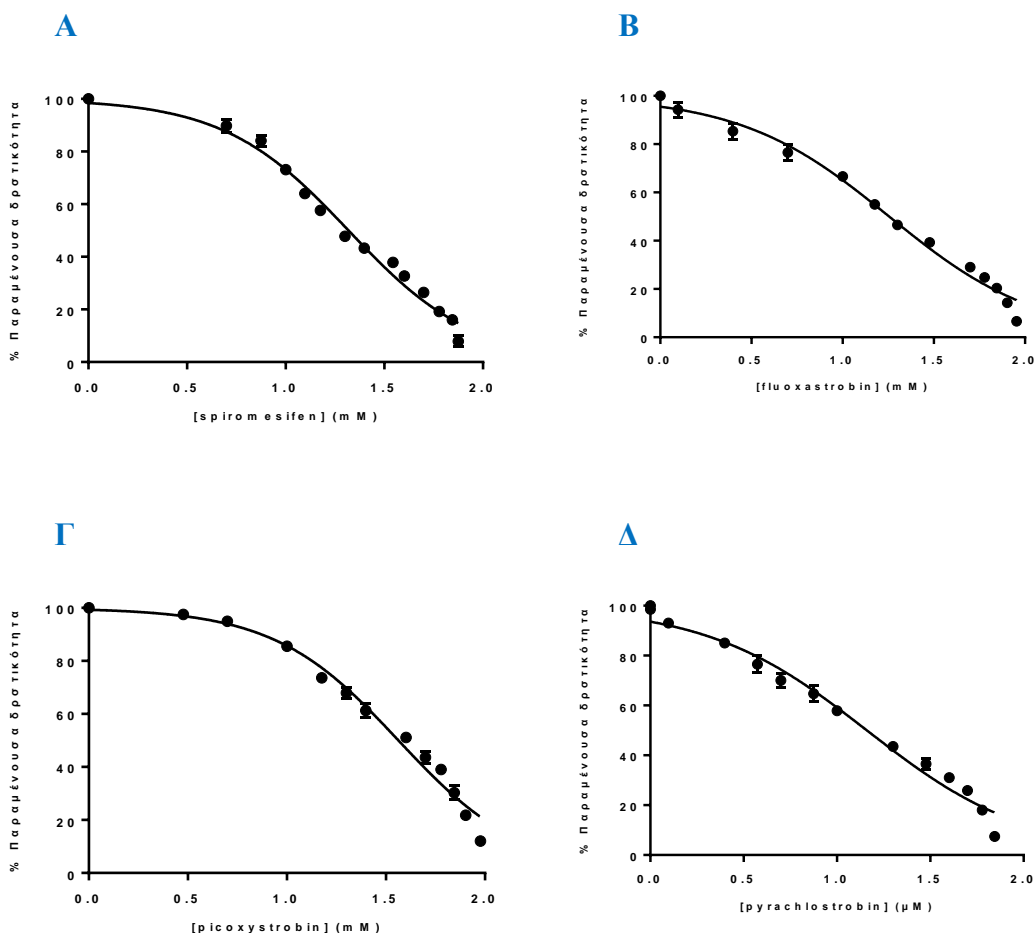
Μυκητοκτόνα	Ανιλίδια	Metalaxyl	97,1
		Fenhexamid	61,1
	Στρομπιλουρίνες	Fluoxastrobin	0
		Kresoxim-methyl	72,2
		Picoxystrobin	0
		Pyraclostrobin	0
		Trifloxystrobin	0
	Δικαρβοξιμίδια	Fenamidone	87,3
		Iprodione	80,0
		Vinclozolin	64,1
		Epoxiconazole	71,1
		Τριαζόλια	Prothioconazole
	Αμίδιο	Triadimenol	83,3
		Mandipropamid	81,5
	Ανίλικο-πυριμιδίνη	Pyrimethanil	88,3
	Βενζαμίδιο	Zodium zoxide	69,9
		Fluopyram	86,7
	Βενζιμιδαζόλιο	Carbedazim	95,1
	Φαινυλοπυρρολικό	Fludioxonil	89,3
	Οργανοφωσφορικοί εστέρες	Tolclofosmethyl	74,7

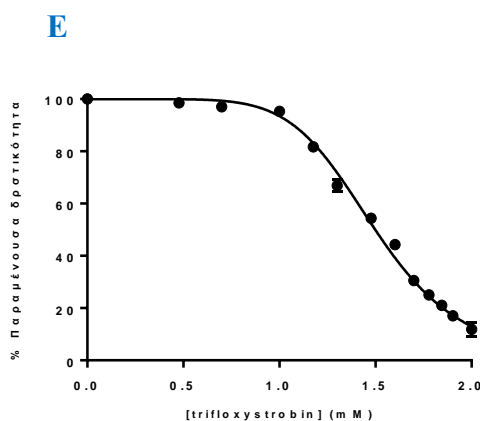
Τα φυτοπροστατευτικά έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες με βάση το ποσοστό της αναστολής που παρουσιάζουν :

- i. *Ομάδα ενώσεων υψηλής αναστολής:* περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά spiromesifen, fluaxostrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin και trifloxystrobin οι οποίες παρουσιάζουν κατά προσέγγιση ολική αναστολή του ισοενζύμου shII5.

- ii. *Ομάδα ενώσεων μέτριας αναστολής:* περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά alachlor, β -endosulfan, diflubenzuron, triflumuron, fenhexamid και vinclozolin τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου shII5 περίπου από 31 έως 65 %.
- iii. *Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής:* περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα φυτοπροστατευτικά τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου shII5 πάνω 66 %.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το shII5 εμφάνισε ολική αναστολή έναντι του εστέρα τετρονικού οξέος (spiromesifen) και των στρομπιλουρινών (fluaxostrobin, picoxystrobin, pyrachlostrobin και trifloxystrobin) οπότε και μελετήθηκαν περαιτέρω (Εικόνα 3.57). Ειδικότερα, υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} όπως περιγράφεται στην § 2.2.15. Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αναστολέα-φυτοπροστατευτικού, κατά την οποία η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου είναι ίση με το 50 % της αρχικής (Πίνακας 3.19).





Εικόνα 3.57: Καμπύλες συγκέντρωσης φυτοπροστατευτικού παρανένουσας δραστικότητας για το ισοένζυμο shII5 έναντι του (Α) spiromesifen όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 13 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1-75 μM), του (Β) fluoxastrobin όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 14 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,625-90 μM), του (Γ) picoxystrobin όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 12 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1-95 μM), του (Ε) pyrachlostrobin όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 14 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1-70 μM) και του (Ε) trifloxystrobin όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 11 διαφορετικές συγκεντρώσεις (3-120 μM).

Πίνακας 3.19: Τιμές ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) για το ισοένζυμο shII5 έναντι των φυτοπροστατευτικών.

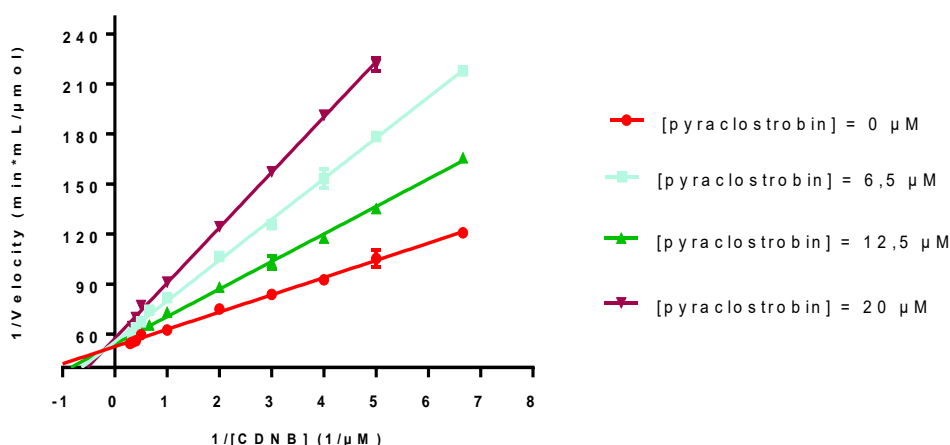
Ένζυμο	Τιμή IC_{50} (μM)
spiromesifen	$20,3 \pm 1,9$
fluoxastrobin	$18,5 \pm 2,2$
picoxystrobin	$42,6 \pm 7,3$
pyrachlostrobin	$13,5 \pm 2,1$
trifloxystrobin	$33,4 \pm 1,8$

Από τον υπολογισμό της τιμής του IC_{50} φάνηκε πως τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Αυτά που εμφανίζουν χαμηλό δείκτη ανασταλτικής ισχύος και αυτά που φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη τιμή. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα pyrachlostrobin (13,5), fluoxastrobin (18,5) και spiromesifen (20,3) ενώ στη δεύτερη τα trifloxystrobin (33,4) και picoxystrobin (42,6). Ως αποτέλεσμα αυτού, επιλέχθηκε να μελετηθεί κινητικά το pyrachlostrobin, που παρουσίασε το μικρότερο δείκτη ανασταλτικής ισχύος και να διερευνηθεί το είδος της αναστολής που επιφέρει στο shII5.

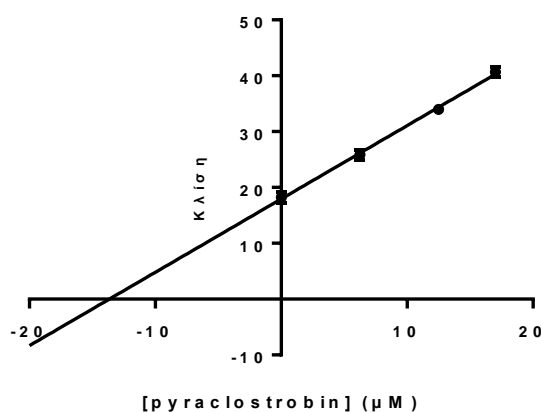
Κινητική μελέτη αναστολής έχοντας το CDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα

Αρχικά, επιλέχθηκε το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την κινητική μελέτη της αναστολής του shII5 από το pyrachlostrobin κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης ($[\text{GSH}] = 2.500 \mu\text{M}$). Οι μεταβαλλόμενες

συγκεντρώσεις του CDNB καλύπτουν το εύρος 16-2.100 μM και μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του φυτοπροστατευτικού (0, 6.2, 12.5 και 20 μM). Σύμφωνα με τη μελέτη, το *pyrachlostrobin* φαίνεται να παρουσιάζει μικτού τύπου αναστολή (Εικόνα 3.58). Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι ευθείες των διπλών αντιστρόφων Lineweaver-Burk τέμνονται στο δεύτερο τεταρτημόριο. Επιπλέον από το δευτερογενές γράφημα υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής $K_{i(\text{pyr})} = 16 \pm 0,9 \mu\text{M}$, ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα (Εικόνα 3.59).



Εικόνα 3.58: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος CDNB (16-2.100 μM) για τρεις σταθερές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin* (0, 6.5, 12.5 και 20 μM).

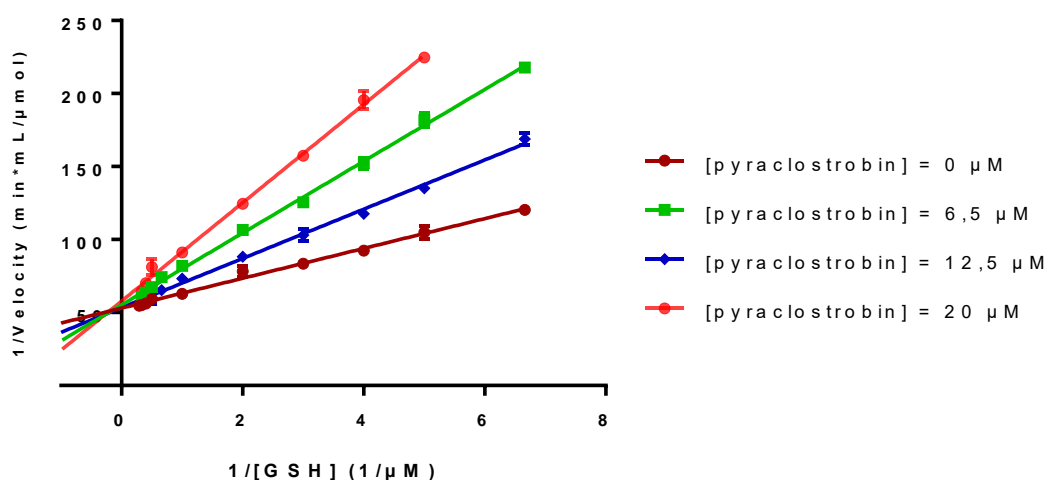


Εικόνα 3.59: Δευτερογενής γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 3.59. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσει της συγκέντρωσης του *pyrachlostrobin*.

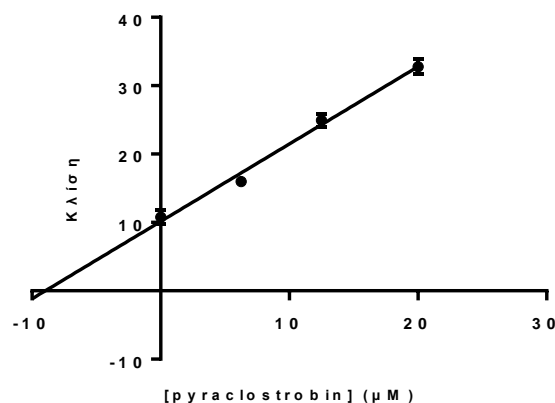
Κινητική μελέτη αναστολής έχοντας τη GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα

Έπειτα, επιλέχθηκε η GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την κινητική μελέτη της αναστολής του shII5 από το *pyrachlostrobin* κρατώντας σταθερή

τη συγκέντρωση του υποστρώματος 1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζολίου ($[CDNB] = 1 \mu M$). Οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του CDNB καλύπτουν το εύρος 60-2.500 μM και μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του φυτοπροστατευτικού (0, 6.2, 12.5 και 20 μM). Σύμφωνα με τη μελέτη, το *pyrachlostrobin* φαίνεται να παρουσιάζει μικτού τύπου αναστολή (Εικόνα 3.60). Η εκτίμηση αυτού του αποτελέσματος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι ευθείες των διπλών αντιστρόφων Lineweaver-Burk τέμνονται στο δεύτερο τεταρτημόριο. Επιπλέον από το δευτερογενές γράφημα υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής $K_{i(pyr)} = 10 \pm 0,8 \mu M$, ως το σημείο τομής της ευθείας με τον οριζόντιο άξονα (Εικόνα 3.61).



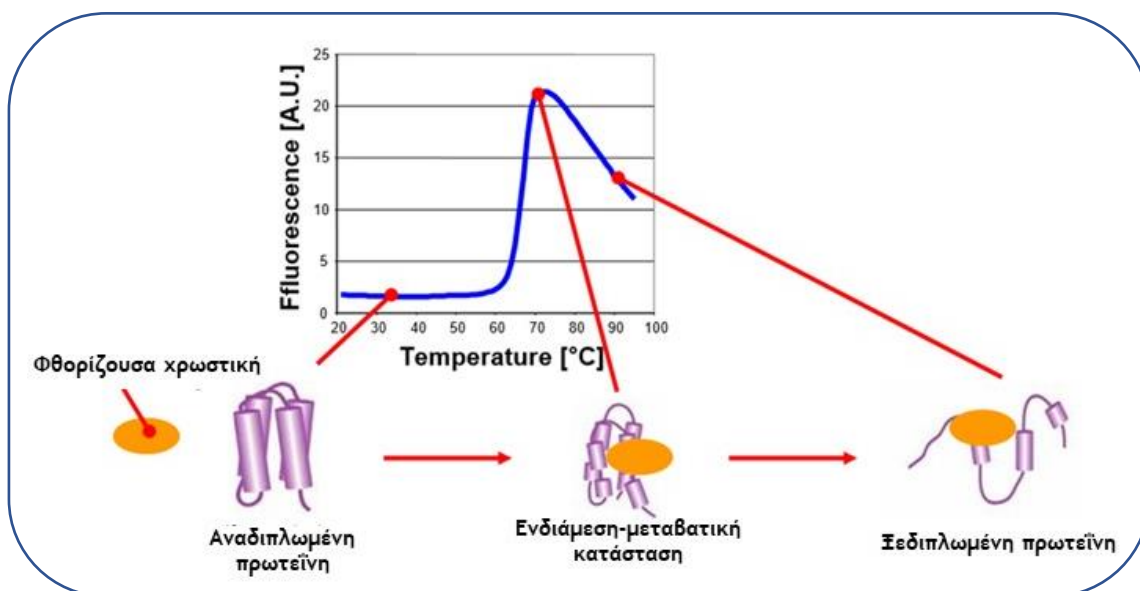
Εικόνα 3.60: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος GSH (60-2.500 μM) για τρεις σταθερές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin* (0, 6.25, 12.5 και 20 μM).



Εικόνα 3.61: Δευτερογενές γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 3.61. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσει της συγκέντρωσης του *pyrachlostrobin*.

3.3.19 Θερμική δοκιμασία μετατόπισης

Η θερμική δοκιμασία μετατόπισης είναι μία δοκιμασία μετουσίωσης για την παρακολούθηση της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών και τη διερεύνηση παραγόντων που επηρεάζουν αυτή τη σταθερότητα (Niesen *et al.*, 2007; Huynh *et al.*, 2015). Η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs του ξεδιπλώματος, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η σταθερότητα των περισσότερων πρωτεϊνών μειώνεται με τη θερμοκρασία καθώς αυτή αυξάνει την ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Το DSF (Differential Scanning Fluorimetry) παρακολουθεί το θερμικό ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών υπό την παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής και πραγματοποιείται με τη χρήση ενός οργάνου Real-time PCR (Εικόνα 3.62). Οι χρωστικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για DSF είναι εξαιρετικά φθορίζουσες σε μη πολικό περιβάλλον, όπως είναι οι υδρόφοβες θέσεις της ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης, σε σύγκριση με υδατικό διάλυμα.



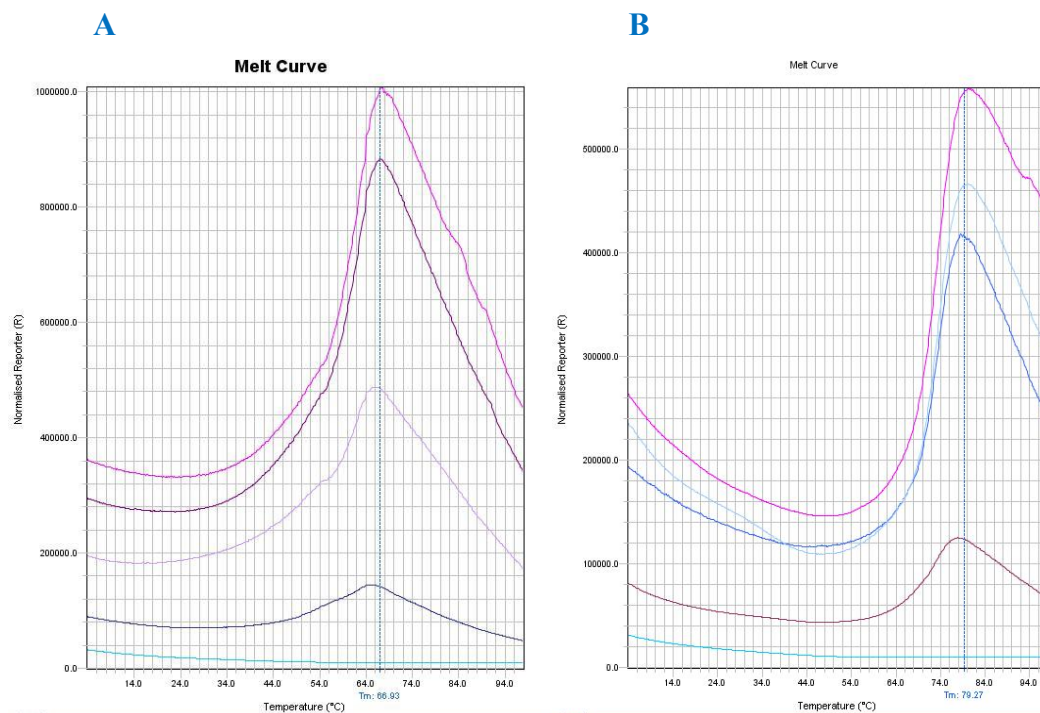
Εικόνα 3.62: Τα στάδια μετουσίωσης της πρωτεΐνης υπό την επίδραση της θερμοκρασίας.

Η ένταση του φθορισμού παριστάνεται γραφικώς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Αυτό δημιουργεί μια καμπύλη που περιγράφει τη μετάβαση από τη μια κατάσταση στην άλλη. Το σημείο καμψής της καμπύλης μετάβασης (T_m) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας απλές εξισώσεις όπως εκείνη του Boltzmann (Childers *et al.*, 2016; Hofmann *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2017).

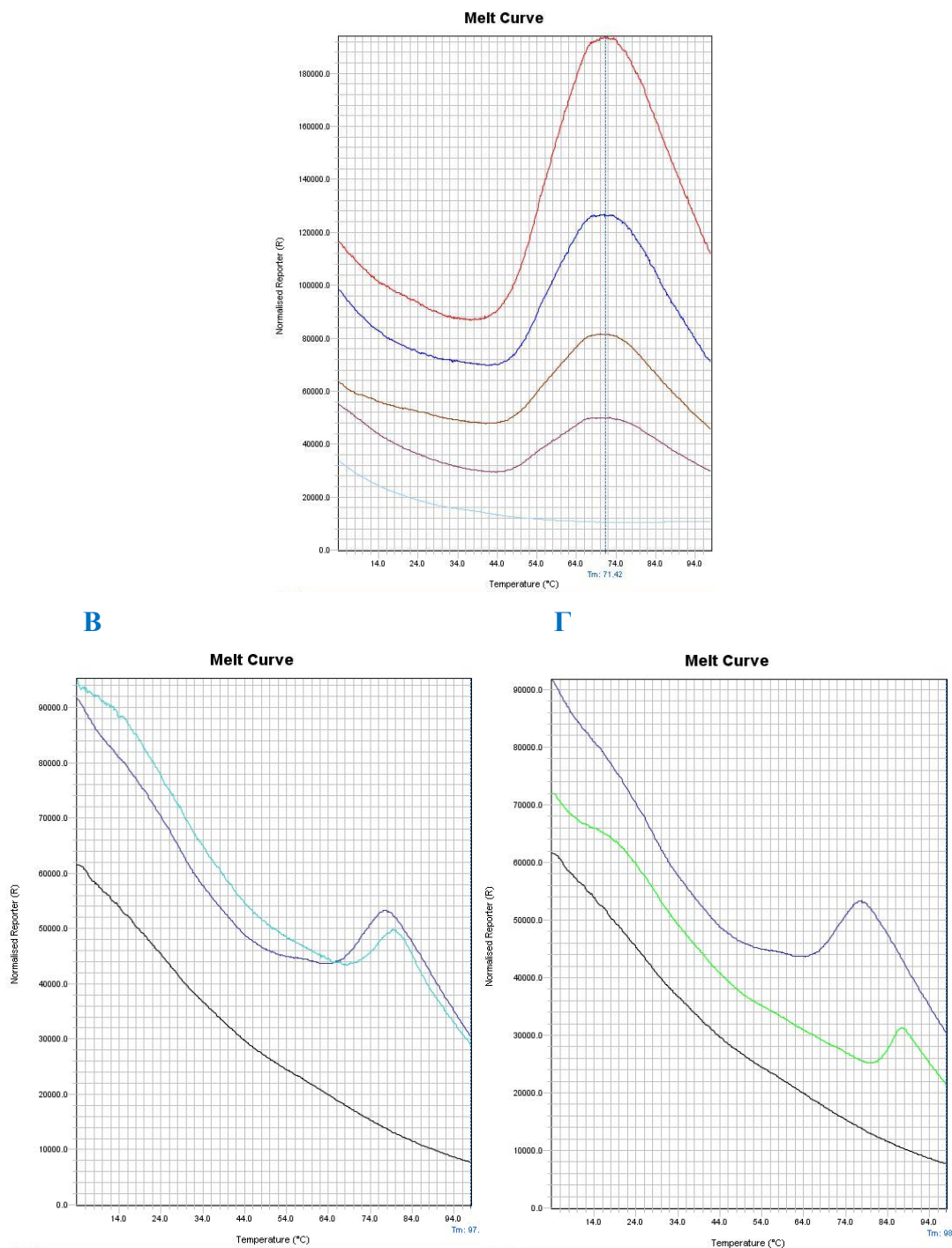
Μελετήθηκε εάν η διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης (μg) επηρεάζει το σημείο τήξεως αυτής. Για το *GmGSTU4-4* χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις πρωτεΐνης:

1,062 μg , 2,95 μg , 6,24 μg , 9,75 μg , για το sh4: 1 μg , 3,5 μg , 5,4 μg , 9,75 μg και για το shII5: 0,56 μg , 1,04 μg , 1,52 μg , 2 μg σε τελικό όγκο 12,5 μL . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών μαζί με κατάλληλη ποσότητα χρωστικής.

Παρατηρήθηκε ότι και για τα τρία ισοένζυμα η διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στην καμπύλη θερμικής μετατόπισης και κατ' επέκταση στη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.63-3.64). Επίσης, μελετήθηκε αν η παρουσία GSH καθώς και S-hexyl GSH επηρεάζει την καμπύλη θερμικής μετατόπισης και σημείο τήξεως του shII5. Παρουσία της GSH φαίνεται πως το ένζυμο εμφανίζει το φαινόμενο της απόσβεσης, δηλαδή μείωση της έντασης του φθορισμού. Επίσης, παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση της καμπύλης θερμικής μετατόπισης προς τα αριστερά. Παρουσία της S-hexyl GSH παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού καθώς και μετατόπιση της καμπύλης θερμικής μετατόπισης προς τα αριστερά, περίπου κατά 12 $^{\circ}\text{C}$ (Εικόνα 3.64.B).



Εικόνα 3.63: Θερμική δοκιμασία μετατόπισης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης για το (A) *GmGSTU4-4*: Control (0 mg), 1,062 mg, 2,95 mg, 6,24 mg, 9,75 mg. (B) sh4: Control (0 mg), 1 mg, 3,5 mg, 5,4 mg, 9,75 mg.

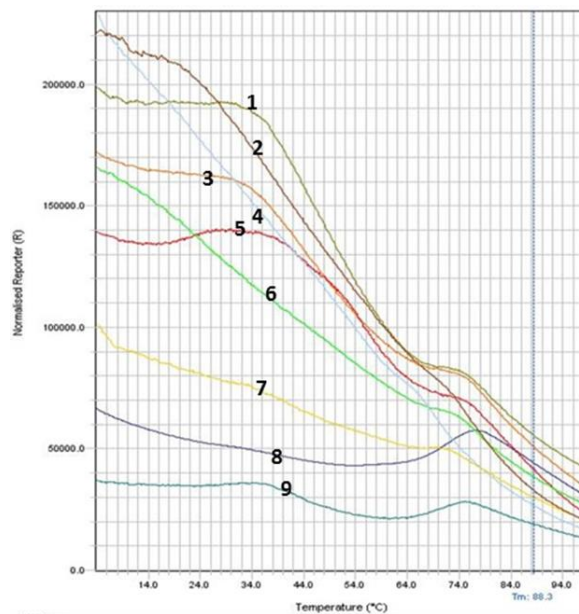


Εικόνα 3.64: Θερμική δοκιμασία μετατόπισης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης για το (A) shII5, 0,56 mg, 1,04 mg, 1,52 mg, 2 mg. (B) παρουσία και απουσία GSH, control (Γ) παρουσία και απουσία S-hexyl GSH, control.

3.3.20 Μελέτη αλληλεπίδρασης του shII5 με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα μέσω θερμικής δοκιμασίας μετατόπισης

Μελετήθηκε η μεταβολή που επιφέρουν στην ένταση του φθορισμού του ενζύμου shII5 τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Χρησιμοποιήθηκε ένας εκπρόσωπος από κάθε κατηγορία. Παρατηρείται πως το σύμπλοκο του ισοενζύμου shII5 με κάθε ένα τα

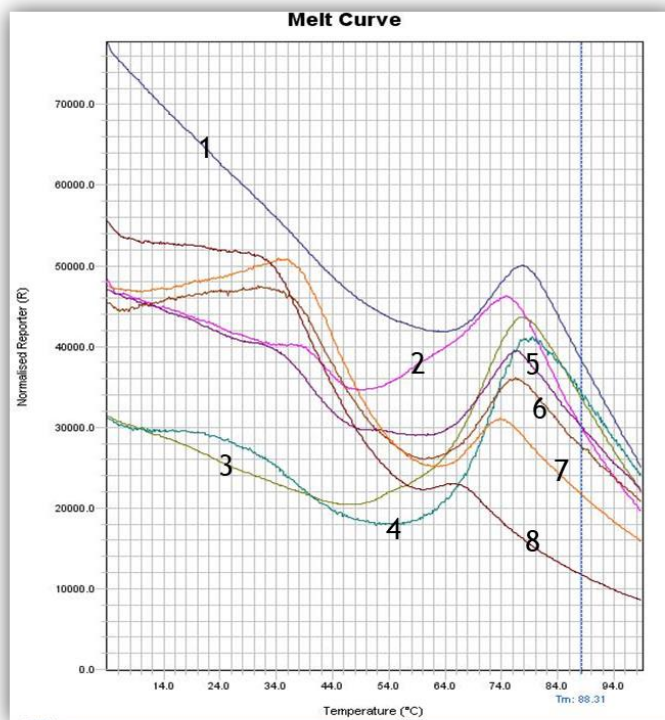
φυτοπροστατευτικά προϊόντα μεταβάλλει την καμπύλη θερμικής μετατόπισης. Ειδικότερα, σχεδόν όλα τα σύμπλοκα φαίνεται να παρουσιάζουν ενίσχυση της έντασης του φθορισμού (Εικόνα 3.65). Επίσης, τα σύμπλοκα με τα diuron, permethrin, alachlor και spiromesifen φαίνεται να μετατοπίζουν το σημείο τήξεως του shII5 προς τα αριστερά, δηλαδή σε μικρότερη θερμοκρασία. Αντίθετα, το σύμπλοκο με το fluorodifen είναι το μοναδικό, από αυτά που μελετήθηκαν, που παρουσιάζει απόσβεση, δηλαδή μείωση της έντασης του φθορισμού. Επιπλέον, παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση του σημείου τήξεως προς τα αριστερά καθώς και μια δεύτερη κορυφή που πιθανόν να οφείλεται στο fluorodifen διότι απουσιάζει από την καμπύλη θερμικής μετατόπισης του shII5. Έτσι, επιλέχθηκε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του shII5 με το fluorodifen πιο διεξοδικά.



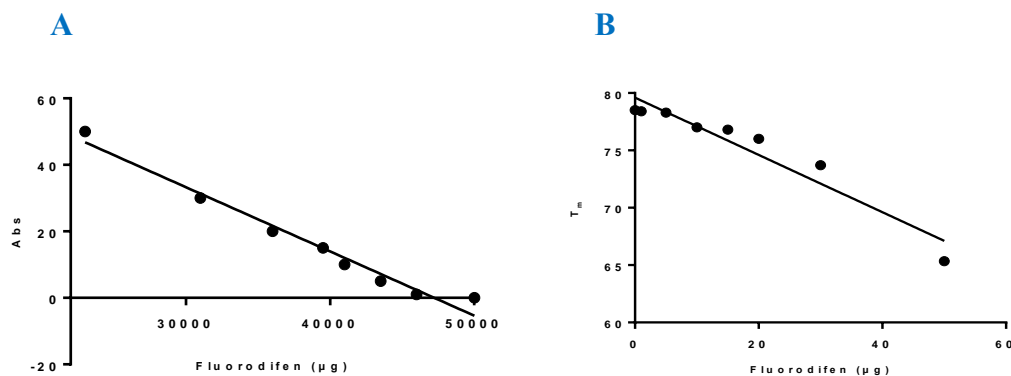
Εικόνα 3.65: Διαφορική σάρωση φθορισμού για το shII5 απουσία (8) και παρουσία 10 μM φυτοπροστατευτικού. Τα φυτοπροστατευτικά είναι 1: diuron, 2: permethrin, 3: alachlor, 4: spiromesifen, 5: b-endosulfan, 6: melathion, 7: imidacloprid, 9: fluorodifen.

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις fluordifen, που κάλυπταν το εύρος από 0-50 μM . Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του fluordifen τόσο αυξάνεται η απόσβεση που παρουσιάζει ο φθορισμός και τόσο μετατοπίζεται η καμπύλη προς τα αριστερά, δηλαδή μειώνεται το σημείο τήξεως του συμπλόκου (Εικόνα 3.66). Παρατηρήθηκε ότι η σχέση μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης και της συγκέντρωσης του fluordifen καθώς και του σημείου τήξεως που παρουσιάζει κάθε καμπύλη μετατόπισης με τη συγκέντρωση του

φυτοπροστατευτικού παρουσιάζει γραμμική συσχέτιση (Εικόνα 3.67). Η συσχέτιση αυτή υποδηλώνει πως το φαινόμενο αυτό έχει κάποια βιολογική σημασία. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του fluorodifen.



Εικόνα 3.66: Καμπύλες θερμικής μετατόπισης για το ισόενζυμο shII5 απουσία (1) και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων fluorodifen. Οι συγκεντρώσεις είναι 1: 0 μM , 2: 1 μM , 3: 5 μM , 4: 10 μM , 5: 15 μM , 6: 20 μM , 7: 30 μM , 8: 50 μM .



Εικόνα 3.67: (A) Συσχέτιση της συγκέντρωσης του fluorodifen και της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων. (B) Συσχέτιση του σημείου τήξεως που εμφανίζει κάθε συγκέντρωση με τη συγκέντρωση του fluorodifen.

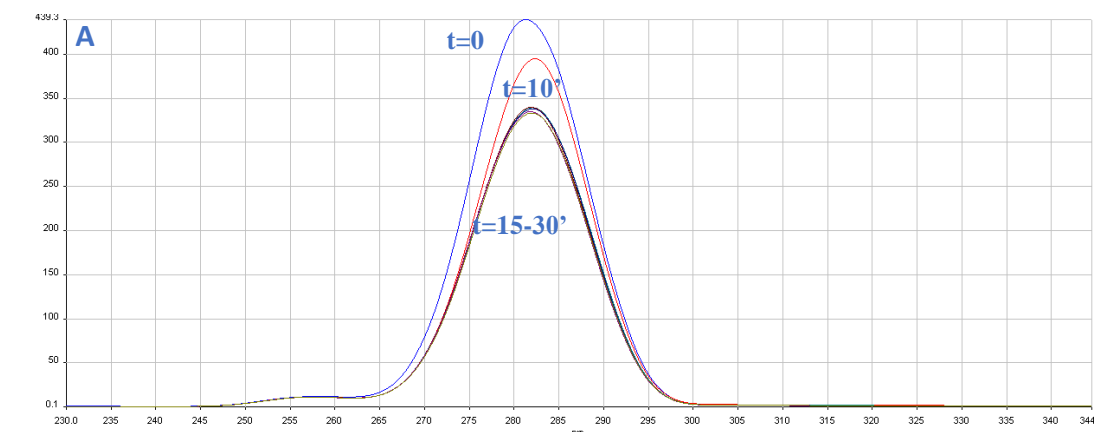
3.3.21 Μελέτη της δομικής αποδιάταξης πρωτεΐνης παρουσία ουρίας με φασματοσπεκτόμετρο φθορισμού

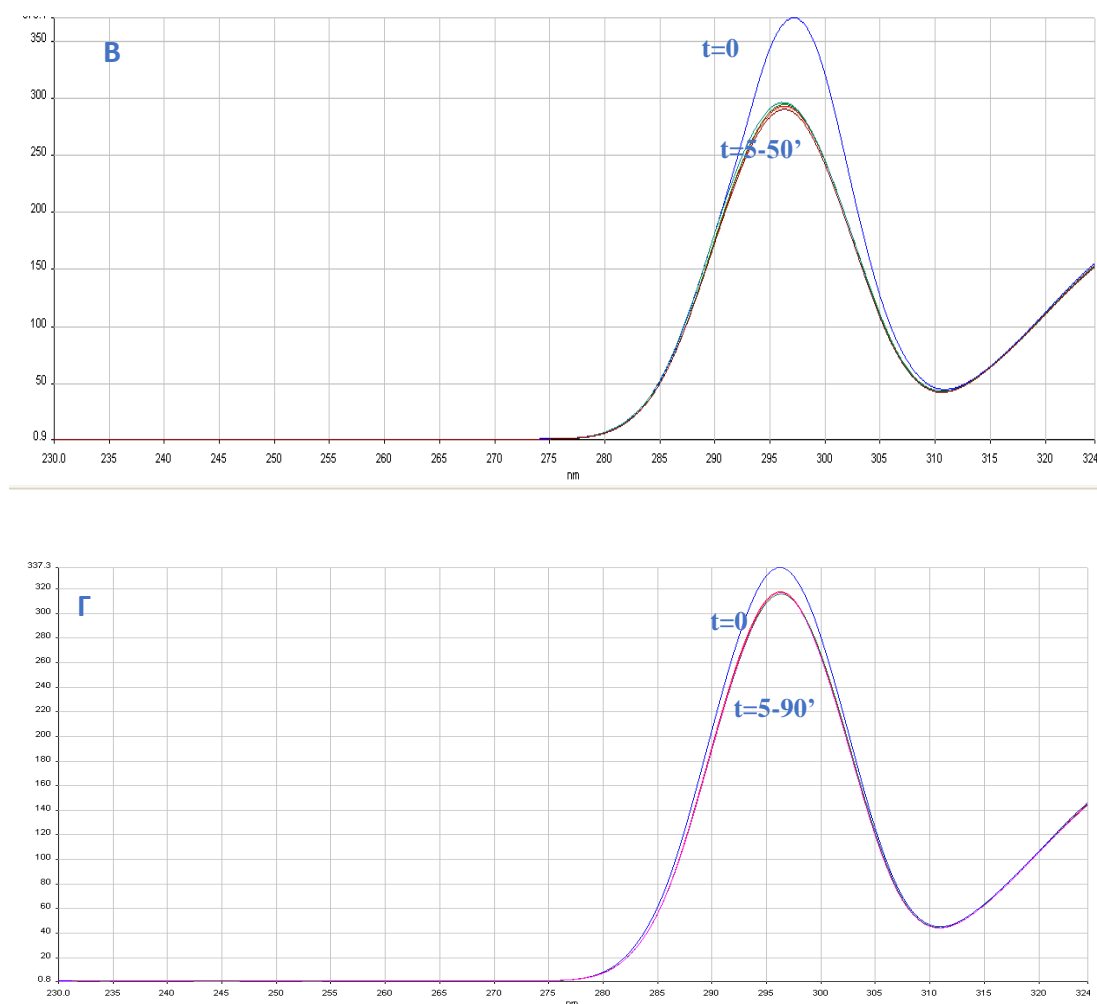
Τα ισοένζυμα *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5* υπεβλήθησαν σε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου, μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο περίπου 500-600 μL και επαναπροσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Πίνακας 3.20).

Πίνακας 3.20: Προσδιορισμός πρωτεΐνης πριν και μετά τη συμπύκνωση και φορές συμπύκνωσης.

Ένζυμο	Πρωτεΐνη (mg/mL) (πριν τη συμπύκνωση)	Πρωτεΐνη (mg/mL) (μετά τη συμπύκνωση)
<i>GmGSTU4-4</i>	0,4	0,8
<i>sh4</i>	0,4	1,5
<i>shII5</i>	0,2	0,6

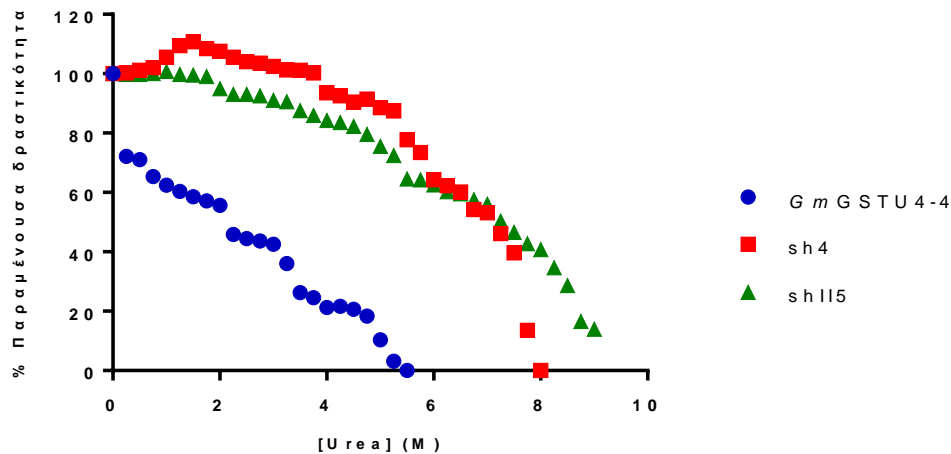
Πραγματοποιήθηκε συλλογή φασμάτων φθορισμού για να διαπιστωθεί ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για να επέλθει ισορροπία στο ενζυμικό παρασκεύασμα και να αρχίσει η θερμική μετουσίωση των ισοενζύμων (Εικόνα 3.68). Οι μετρήσεις έγιναν σε εύρος 280-400 nm, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην § 3.2.2.21. Βρέθηκε ότι για τα ισοένζυμα *sh4* και *shII5* απαιτείται χρονικό διάστημα 10 min ώστε να σταθεροποιηθεί ο φθορισμός. Η μεταβολή του φάσματος φθορισμού, εξαιτίας της θερμικής μετουσίωσης, για το *sh4* πραγματοποιείται μετά την πάροδο 50 min και για το *shII5* μετά από 90 min. Όσο αναφορά στο *GmGSTU4-4* απαιτείται χρόνος 15 min για να σταθεροποιηθεί ο φθορισμός και η ισορροπία αυτή διατηρείται για περίπου 30 min, και ακολούθως παρατηρείται μεταβολή στο φάσμα του ενζύμου (Εικόνα 3.68).





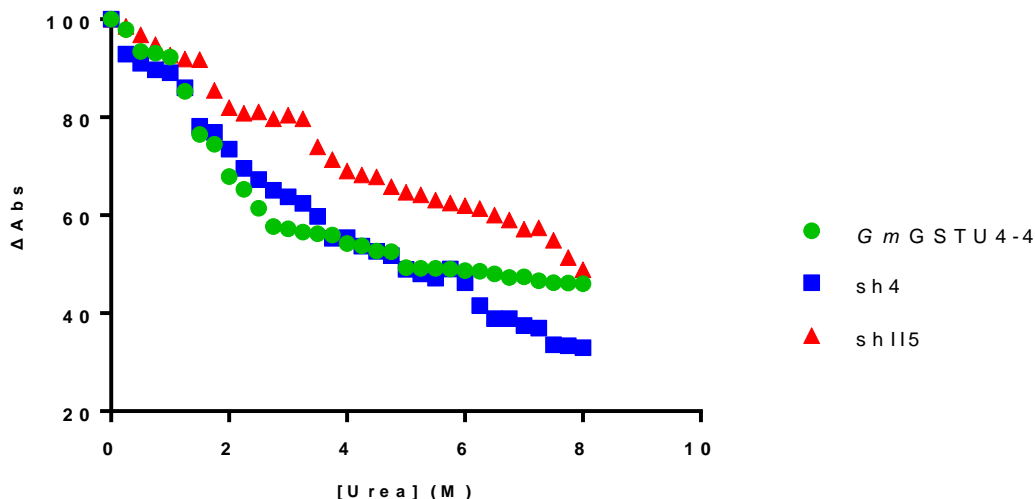
Εικόνα 3.68: Συλλογή φασμάτων φθορισμού για να διαπιστωθεί ο χρόνος που επέρχεται η ισορροπία για τα (Α) *GmGSTU4-4*, (Β) *sh4*, (Γ) *shII5*.

Για να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα των *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5* έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων ουρίας επώαστηκαν, σε κατάλληλο χρόνο κάθε φορά, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ουρία και κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος. Μετά το πέρας της επώασης, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα GSH/CDNB (Εικόνα 3.69). Στην Εικόνα 3.69 φαίνεται πως κάθε ένζυμο συμπεριφέρεται διαφορετικά υπό την επίδραση του αποδιατακτικού παράγοντα. Το *GmGSTU4-4* εμφανίζει μικρότερη ανοχή σε σχέση με τα άλλα δύο ισοένζυμα. Μόλις 2,2 Μ ουρίας απαιτούνται για να επιφέρουν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στο μισό της αρχικής της τιμής. Αντίθετα, τα άλλα δύο ισοένζυμα, *sh4* και *shII5*, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή στην καταπόνηση από την ουρία. Η συγκέντρωση της ουρίας που επιφέρει 50 % μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου *sh4* είναι τα 6,7 Μ ενώ για το *shII5* είναι τα 6,9 Μ (Εικόνα 3.69).

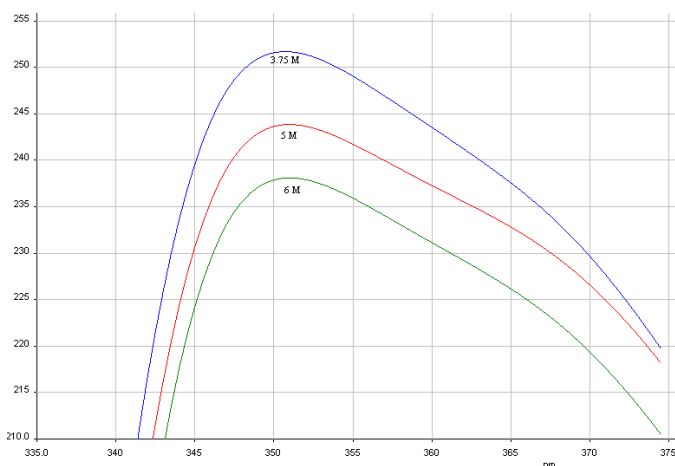


Εικόνα 3.69: Συγκριτική παρουσίαση της επίδραση της ουρίας στην ενζυμική δραστηριότητα των *GmGSTU4-4*, *sh4* και *shII5*.

Επιπλέον, μελετήθηκε η μεταβολή της απορρόφηση των φασμάτων φθορισμού στις διάφορες συγκεντρώσεις ουρίας όταν η διέγερση είναι στα 280 nm και η εκπομπή στα 320 nm (Εικόνα 3.70). Στα 280 nm παρατηρείται η διέγερση που οφείλεται στα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των φασμάτων αφαιρώντας την απορρόφηση του υποβάθρου (Εικόνα 3.71). Επίσης, παρατηρείται πως και για τα τρία ισοένζυμα η γραφική παράσταση της μεταβολής της απορρόφησης εμφανίζει πτωτική τάση. Ειδικότερα, η μείωση της μεταβολής της απορρόφησης για το *shII5* πραγματοποιήθηκε με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, το *GmGSTU4-4* μεταβαίνει από τρεις ενδιάμεσες καταστάσεις μέχρι την πλήρη αποδιάταξη του. Η πρώτη εμφανίζεται περίπου μέχρι τα 1,75 M ουρίας, η δεύτερη περίπου μέχρι τα 5 M και η τρίτη μέχρι τα 8 M. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και με το ισοένζυμο *shII5*. Μεταβαίνει και αυτό από τρεις ενδιάμεσες καταστάσεις όπου η πρώτη εμφανίζεται στα περίπου στα 2 M ουρίας, η δεύτερη περίπου στα 3,5 M και η τρίτη μέχρι τα 8 M. Τέλος, το *sh4* μεταβαίνει από δύο ενδιάμεσες καταστάσεις με τη συγκέντρωση της μετάβασης να εμφανίζεται περίπου στα 6 M (Εικόνα 3.70).



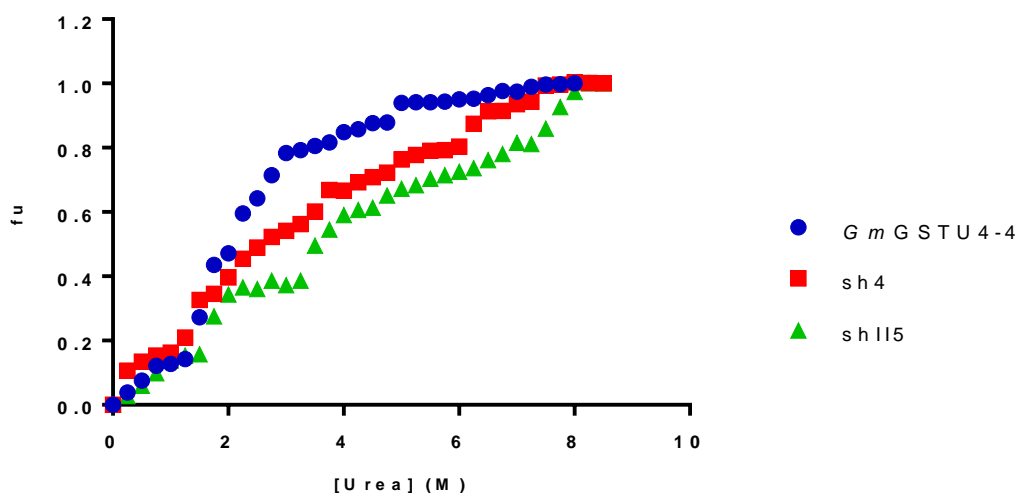
Εικόνα 3.70: Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της απορρόφησης φθορισμού (διέγερση 280 nm, εκπομπή 320 nm) έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων ουρίας για τα ένζυμα *GmGSTU4-4*, sh4 και shII5.



Εικόνα 3.71: Φάσματα φθορισμού για το ισοένζυμο *GmGSTU4-4* για τις συγκεντρώσεις 3,75 M, 5 M και 6 M ουρίας (διέγερση 280 nm, εκπομπή 320 nm).

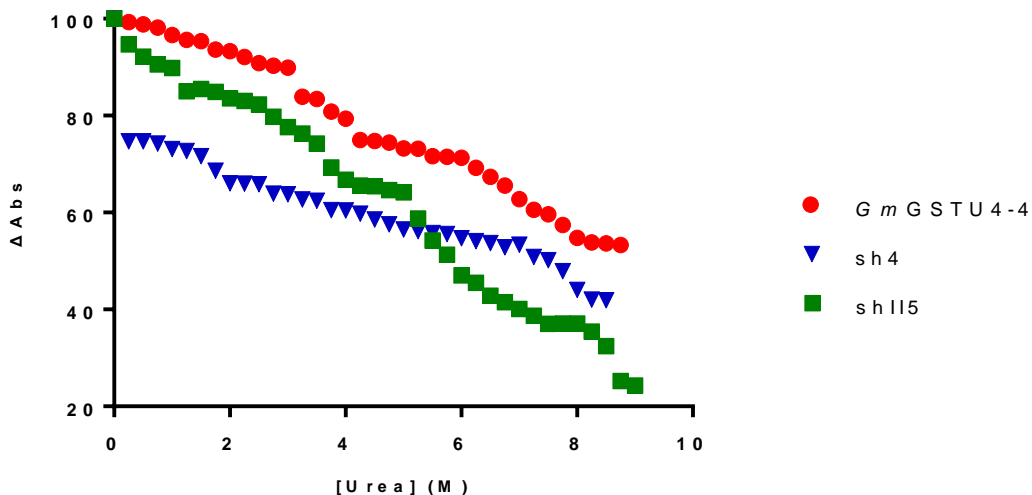
Στην Εικόνα 3.72 υπολογίστηκε το κλάσμα της πρωτεΐνης που έχει ξεδιπλωθεί έναντι της συγκέντρωσης της ουρίας για κάθε ισοένζυμο. Το *GmGSTU4-4* μεταβαίνει από τρεις ενδιάμεσες καταστάσεις για να καταλήξει στην τελική αποδιάταξη. Η πρώτη φαίνεται να εμφανίζεται σε συγκέντρωση 2 M ουρίας, η δεύτερη σε συγκέντρωση 5 M και η τρίτη μέχρι τα 8 M. Το ίδιο πρότυπο ακολουθεί και το sh4. Η πρώτη ενδιάμεση κατάσταση είναι περίπου μέχρι τη συγκέντρωση 1,25 M ουρίας, η δεύτερη μέχρι τα 6 M και η τρίτη μέχρι τα 8,5 M. Τέλος, όσον αφορά στο ισοένζυμο shII5 μεταβαίνει και αυτό από τρεις διαφορετικές καταστάσεις προτού αποδιαταχτεί εντελώς, η πρώτη σε

συγκέντρωση ουρίας 1,75 M, η δεύτερη σε συγκέντρωση 3,25 M και η τρίτη μέχρι τα 8 M (Εικόνα 3.72).

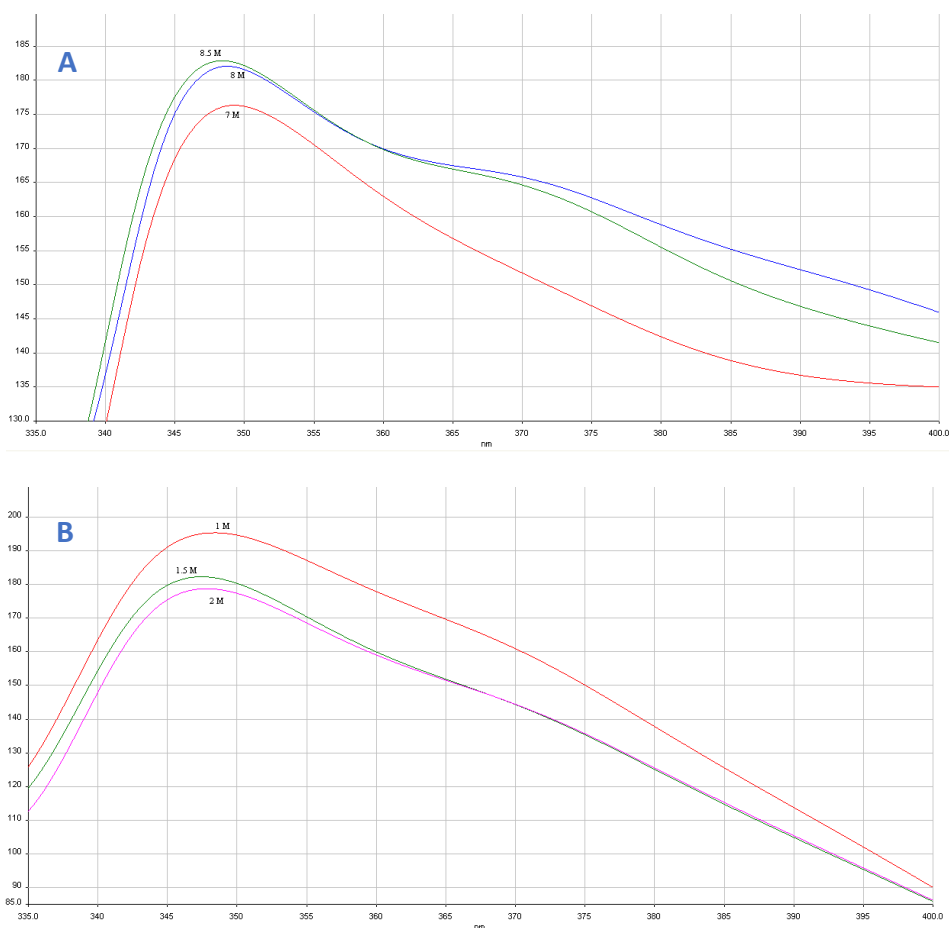


Εικόνα 3.72: Συγκριτική παρουσίαση της επίδρασης της συγκέντρωσης της ουρίας στην αποδιάταξη κάθε ενζύμου. Όπου f_u είναι το κλάσμα της πρωτεΐνης που έχει ξεδιπλωθεί όπως προσδιορίζεται με το φασματοσπεκτόμετρο φθορισμού (διέγερση 280 nm, εκπομπή 320 nm).

Ακολούθως μελετήθηκε η μεταβολή της απορρόφηση των φασμάτων στις διάφορες συγκεντρώσεις ουρίας όταν η διέγερση είναι στα 295 nm και η εκπομπή στα 320 nm. Στα 295 nm παρατηρούμε τη διέγερση που οφείλεται στο αμινοξύ τυροσίνη (Εικόνα 3.73). Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των φασμάτων αφαιρώντας την απορρόφηση του υποβάθρου (Εικόνα 3.74). Η μείωση της μεταβολής της απορρόφησης για το *GmGSTU4-4* πραγματοποιήθηκε με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με τα υπόλοιπα ισοένζυμα, το οποίο μεταβαίνει από τρεις ενδιάμεσες καταστάσεις μέχρι την πλήρη αποδιάταξη του. Η πρώτη εμφανίζεται περίπου μέχρι τα 3 M ουρίας, η δεύτερη περίπου μέχρι τα 4 M και η τρίτη μέχρι τα 8,5 M. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και με το ισοένζυμο *sh4* που μεταβαίνει και αυτό από τρεις ενδιάμεσες καταστάσεις με την πρώτη εμφανίζεται στα περίπου στα 2 M ουρίας, η δεύτερη περίπου στα 7 M και η τρίτη μέχρι τα 8,5 M. Τέλος, το *shII5* ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά, με την πρώτη ενδιάμεση κατάσταση να εμφανίζεται περίπου στα 1,75 M, τη δεύτερη περίπου στα 5 M και η τρίτη μέχρι τα 9 M (Εικόνα 3.73).

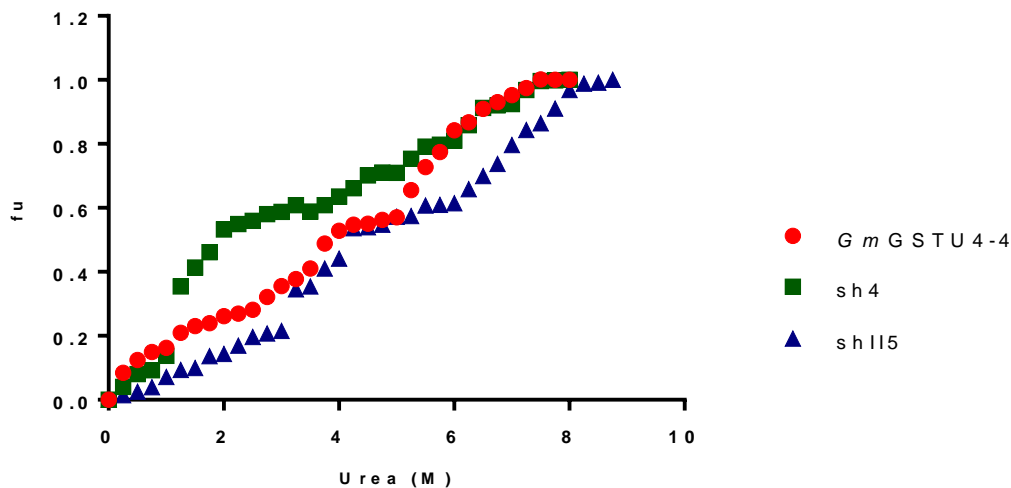


Εικόνα 3.73: Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της απορρόφησης φθορισμού έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων ουρίας (διέγερση 295 nm, εκπομπή 320 nm).



Εικόνα 3.74: Φάσματα φθορισμού για το ισοένζυμο (A) sh4 για τις συγκεντρώσεις 7 M, 8 M και 8,5 M ουρίας και για το ένζυμο (B) shII5 για τις συγκεντρώσεις 1 M, 1,5 M και 2 M (διέγερση 280 nm, εκπομπή 320 nm).

Στην Εικόνα 3.75 φαίνεται το κλάσμα της πρωτεΐνης που έχει ξεδιπλωθεί έναντι της συγκέντρωσης της ουρίας για κάθε ισόενζυμο. Παρατηρούμε πως ο άγριος τύπος μεταβαίνει από τρεις φάσεις για να καταλήξει στην τελική αποδιάταξη, μία στα 3,75 Μ και μία στα 5,75 Μ. Το sh4 περνάει και αυτό από τρεις διαφορετικές μεταβατικές καταστάσεις. Η πρώτη είναι περίπου μέχρι τη συγκέντρωση 2 Μ ουρίας, η δεύτερη μέχρι τα 6,25 Μ ουρίας και η τρίτη μέχρι τα 8 Μ. Τέλος, όσον αφορά στο shII5 ακολουθεί και αυτό το ίδιο πρότυπο προτού αποδιαταχτεί εντελώς. Η πρώτη ενδιάμεση κατάσταση εμφανίζεται σε συγκέντρωση 3 Μ ουρίας, η δεύτερη σε συγκέντρωση 6,25 Μ και η τρίτη μέχρι τα 9 Μ (Εικόνα 3.75).



Εικόνα 3.75: Συγκριτική παρουσίαση της επίδραση της συγκέντρωσης της ουρίας στην αποδιάταξη κάθε ενζύμου. Όπου f_u είναι το κλάσμα της πρωτεΐνης που έχει ξεδιπλωθεί όπως προσδιορίζεται με το φασματοσπεκτόμετρο φθορισμού (διέγερση 295 nm, εκπομπή 320 nm).

3.4 Συζήτηση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σάρωση βιβλιοθήκης η οποία δημιουργήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας από τη Δρ. Αξαρή μέσω της διαδικασίας της ενζυμικής κατευθυνόμενης εξέλιξης (Axarli *et al.*, 2016). Την πατρική γενεά αποτέλεσαν τα ένζυμα *GmGSTU2-2*, *GmGSTU4-4* και *GmGSTU10-10*. Τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν ομολογία πάνω από 88 %. Οι χημικές πρωτεΐνες που προέκυψαν αποτελούνται τόσο από εναλλαγές κομματιών των πατρικών γονιδίων όσο και από σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν από λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Οι αποικίες επιλέχθηκαν με γνώμονα αφενός μεν την υψηλή ειδική δραστηριότητα που παρουσίασαν και αφετέρου την υψηλή απορρόφηση με το σύστημα GSH/alachlor. Επιλέχθηκαν επτά αποικίες (Se 7, Se 12, Se 22, Se 23, Se 26, Se 32, Se 34) οι οποίες αποτέλεσαν μήτρα για το δεύτερο κύκλο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Ακολούθησε σάρωση των αποικιών με το σύστημα CDNB/GSH. Επιλέχθηκαν τρεις (sh4, sh15 και sh19) με βάση την ενζυμική δραστηριότητα που εμφάνισαν, οι οποίες αλληλουχήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα, εκφράστηκαν ετερόλογα και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το σύστημα GSH/CDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές για τις μεταλλαγμένες μορφές. Όσον αφορά στο CDNB τα ισοένζυμα εμφανίζουν σχετικά υψηλή K_m , με υψηλότερη αυτή του sh4 (0,4 mM), που βρίσκεται μέσα στο εύρος που κυμαίνονται οι GSTs (Pavlidis *et al.*, 2015; Bartolini *et al.*, 2015). Όμως, το sh15 φαίνεται να έχει πολύ μεγαλύτερη σταθερά εξειδίκευσης σε σχέση τα υπόλοιπα. Περίπου δύο φορές μεγαλύτερη από το sh19 (77,4 min⁻¹) και τέσσερις φορές από το sh4 (35,6 min⁻¹). Όταν το μεταβαλλόμενο υπόστρωμα είναι η GSH η K_m για τα ισοένζυμα sh4 και sh15 είναι περίπου η ίδια ενώ για το sh19 σχεδόν διπλάσια.

Ακολούθησε σάρωση των ισοενζύμων με διαφορετικά υποστρώματα για να μελετηθεί η εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν. Πιο συγκεκριμένα, το *GmGSTU4-4* εμφανίζει μικρότερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τις τρεις μεταλλαγμένες μορφές. Καλύτερο υπόστρωμα για όλα τα ένζυμα φαίνεται να είναι το FDNB. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα και το CDNB διαφέρουν μόνο ως προς το αλογόνο που φέρουν (Park *et al.*, 2009; Chronopoulou *et al.*, 2014; Perperopoulou *et al.*, 2016, Poulidou *et al.*, 2017).

Επίσης, παρατηρούμε πως το *GmGSTU4-4* εμφανίζει αξιοσημείωτη ειδική δραστικότητα με το fluorodifen.

Παράλληλα, λύθηκε η κρυσταλλοδομή του ισοενζύμου sh4. Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Δρ. Παπαγεωργίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εξάτμισης της κρεμάμενης σταγόνας και η δομή προσδιορίστηκε με ανάλυση σε 2,27 Å. Πολλές κρυσταλλοδομές ισοενζύμων της *tau* τάξης έχουν επιλυθεί. Χαρακτηριστικό παραδείγματα αποτελεί η δομή του ισοενζύμου (*GmGSTU4-4*), με κωδικό PDB 2no4, από την Axarli και τους συνεργάτες της (Axarli *et al.*, 2009). Άλλο παράδειγμα αποτελεί η κρυσταλλική δομή της GSTZ1 από *Arabidopsis thaliana*, με κωδικό pdb 1LJR (Thom *et al.*, 2001). Στην κρυσταλλοδομή του ισοενζύμου sh4 παρατηρήθηκε ότι το τριπεπίδιο γλυκίνη-ισολευκίνη-γλουταμινικό οξύ (GIE) που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εισέρχεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και προσομοιάζει τον τρόπο δέσμευσης της GSH (γ-γλουταμινικό οξύ-κυστεΐνη-γλυκίνη). Έτσι, συντέθηκε το τριπεπίδιο GIE για να διαπιστωθεί ο πιθανός βιολογικός ρόλος της αλληλεπίδρασης, δηλαδή αν λειτουργεί ως υπόστρωμα ή ως αναστολέας των ενζύμων. Το τριπεπίδιο GIE φαίνεται να μη λειτουργεί ως υπόστρωμα λόγω της απουσίας κυστεΐνης. Η πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης χαρακτηρίζεται από την παρουσία της χαρακτηριστικής ομάδας του σουλφυδρυλίου (-SH), γεγονός που κατατάσσει το αμινοξύ στις θειόλες. Το σουλφυδρύλιο της κυστεΐνης είναι πολύ δραστικό και συμμετέχει σε ποικίλες ενζυμικές αντιδράσεις ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο. Οι περισσότερες έρευνες φανερώνουν ότι τα πεπτίδια που προορίζονται για πιθανά υποστρώματα των GSTs περιέχουν κυστεΐνη (Joshi *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

Το πεπτίδιο που συντέθηκε λειτουργεί ως αναστολέας και για τα τρία ισοένζυμα. Η αναστολή που επιφέρει αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ένδειξη για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης. Μελέτη για πεπτίδια που λειτουργούν ως αναστολείς πραγματοποίησε η Zompra και οι συνεργάτες της. Αυτοί μελέτησαν την αναστολή που επέφεραν πεπτίδια με διαφορετικό μοριακό βάρος στα αλλοένζυμα της *pi* τάξης της hGST (Zompra *et al.*, 2016). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μελέτη του Khan και των συνεργατών του όπου και χρησιμοποίησαν πεπτιδικούς αναστολείς για το ανθρώπινο ισοένζυμο GSTP (Khan *et al.*, 2015). Επίσης, μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας φθορισμού παρατηρήθηκε πως το πεπτίδιο GIE επιφέρει το φαινόμενο

της απόσβεσης όταν συμπλοκοποιείται με το ισοένζυμο shII5, δηλαδή παρουσιάζει μείωση της έντασης του φθορισμού, γεγονός που δείχνει πως το σύμπλοκό του με το ισοένζυμο shII5 γίνεται πιο σταθερό.

Εντούτοις, θελήσαμε να αυξήσουμε ακόμα περισσότερο την πολυπλοκότητα και προχωρήσαμε σε ένα νέο κύκλο κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης. Ως μήτρα αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν οι αποικίες που εμφάνισαν ενζυμική δραστηριότητα, με το σύστημα CDNB/GSH, στο δεύτερο κύκλο της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Και σε αυτή την περίπτωση επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω τρεις αποικίες (shII5, shII6 και shII7), οι οποίες εμφάνισαν μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα (με το σύστημα CDNB/GSH) σε σχέση με τις υπόλοιπες. Αυτές, εμφανίζουν υψηλή ομολογία τόσο μεταξύ τους όσο και με τις αποικίες που μελετήθηκαν από τον πρώτο και το δεύτερο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν αλληλουχήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pETite, εκφράστηκαν ετερόλογα και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.

Ακολούθησε κινητική μελέτη των ισοενζύμων για το σύστημα GSH/CDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές για τις μεταλλαγμένες μορφές. Όσον αφορά στο CDNB, τα ισοένζυμα shII5 και shII6 εμφανίζουν σχεδόν παρόμοια τιμή K_m (~0,36 mM) ενώ το shII7 μικρότερη (0,24 mM). Έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH, το shII7 παρουσιάζει αρκετά υψηλή K_m , δηλαδή δεν εμφανίζει συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Επίσης, το shII5 φαίνεται να έχει σχετικά υψηλή K_m (0,5 mM) ενώ το shII6 0,2 mM. Η k_{cat} για το shII7 είναι πέντε φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με το shII5 και το shII6.

Πραγματοποιήθηκε και σε αυτήν την περίπτωση σάρωση διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων για να μελετηθεί η εκλεκτικότητα των ισοενζύμων. Αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα σε σύγκριση με το *GmGSTU4-4* αλλά μικρότερη σε σχέση με τα ισοένζυμα από το δεύτερο κύκλο κατευθυνόμενης εξέλιξης (sh4, sh15, sh19). Και σε αυτή την περίπτωση, τα ισοένζυμα φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα με το FDNB. Η ειδική δραστηριότητα που φαίνεται να έχουν τα ισοένζυμα έναντι του βενζοϊκού υδροϋπεροξειδίου κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με το FDNB και προσδίδει δράση υπεροξειδάσης στα συγκεκριμένα ένζυμα. Οι GSTs δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή ειδική δραστηριότητα με το συγκεκριμένο υπόστρωμα και αυτό επιβεβαιώνεται από αρκετές μελέτες, όπως αυτή της

Chronopoulou και των συνεργατών της, της Gupta και των συνεργατών της και του Wang και των συνεργατών του (Wang *et al.*, 2013; Chronopoulou *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015).

Για να μελετηθεί η θερμοσταθερότητα των ισοένζυμα που προέκυψαν καθώς και του άγριου τύπου υπολογίστηκε το σημείο τήξεως (T_m). Αναλυτικότερα, το *GmGSTU4-4* παρουσιάζει σημείο τήξεως στους 66,3 °C ενώ το *sh4* στους 75,1 °C και το *shII5* στους 73,6 °C. Μέσω των συνεχόμενων κύκλων της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης αυξήθηκε το σημείο τήξεως των ενζύμων περίπου κατά 10 °C. Παράλληλα, μελετήθηκε κινητικά η επίδραση της θερμοκρασίας και προσδιορίστηκε η σταθερότητα των ενζύμων σε τέσσερις θερμοκρασίες (50, 60, 70 και 80 °C). Παρόμοια μελέτη θερμοδυναμικής σταθερότητας διεξήχθη από τον Pandey και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν κινητικά τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που μελέτησαν ανήκαν στη *chi* κλάση και δεν ήταν ιδιαιτέρως θερμοσταθερές (Pandey *et al.*, 2015).

Όπως συμβαίνει στις περισσότερες χημικές αντιδράσεις, έτσι και σ' αυτές που καταλύονται από ένζυμα η ταχύτητά τους μεταβάλλεται ανάλογα με τη μεταβολή της θερμοκρασίας (Ouyang *et al.*, 2017). Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια ορισμένη θερμοκρασία (άριστη), στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης γίνεται μέγιστη. Τα περισσότερα ένζυμα δρουν βέλτιστα σε θερμοκρασίες μεταξύ 35-38 °C (Zhou *et al.*, 2008; Kumwenda *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Με την αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από αυτό το όριο, η ταχύτητα της αντίδρασης αρχίζει να ελαττώνεται καθώς μειώνεται η δραστηριότητα των ενζύμων (Sharma *et al.*, 2017). Γύρω στους 50 °C η μεταβολή στη δράση των ενζύμων γίνεται "μόνιμη" και δεν επανέρχεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια χάνουν την τριτοταγή δομή τους, χάρη στην οποία είναι δραστικά (Wintrobe and Arnold, 2000). Τα ένζυμα επηρεάζονται και από μεταβολές του pH (Peng *et al.*, 2017). Ισχυρά όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει τη μερική ή ολική αναστολή της λειτουργίας τους. Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια ορισμένη τιμή του pH, κατά την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μέγιστη (Jo *et al.*, 2014). Για τα περισσότερα ένζυμα η τιμή αυτή κυμαίνεται μεταξύ των τιμών pH 5-9. Επειδή, λοιπόν, η θερμοκρασία και το pH είναι δύο παράγοντες που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ενζυμική δραστηριότητα μεταβάλλοντας τη στερεοδομή του ενζύμου, μελετήθηκαν

αναλυτικά. Το shII5 φαίνεται να εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία τους 55 °C ενώ τα shII6 και shII7, δέκα βαθμούς υψηλότερη, στους 65 °C. Και τα τρία ισοένζυμα έχουν βέλτιστη θερμοκρασία πέραν των αναμενόμενων ορίων για τις GSTs. Οι GSTs είναι ένζυμα τα οποία δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλό σημείο τήξεως καθώς δεν είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες (Jemec *et al.*, 2010; Moasser *et al.*, 2012; Umasuthan *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2012). Όσον αφορά στο pH τα shII5 και shII7 εμφανίζουν βέλτιστο pH στο 6,6 ενώ το shII6 στο 7,2. Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει από τον Sayed και τους συνεργάτες του, τον Wang και τους συνεργάτες του, από τον Sindhu και τους συνεργάτες του, κ.ά. (Sayed *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Sindhu *et al.*, 2016)

Ακολούθησε σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ενζύμου shII5. Από τη σάρωση φαίνεται ότι οι στρομπιλουρίνες (fluoxastrobin, picoxystrobin, pyrachlostrobin και trifloxystrobin) και ένας εστέρας του τετρονικού οξέος (spiromesifen) αναστέλλουν πλήρως την ενζυμική δραστηριότητα του shII5. Σε αυτούς τους αναστολείς υπολογίστηκε ο δείκτης ανασταλτικής ισχύος (IC₅₀) όπου το *pyrachlostrobin* εμφάνισε τη μικρότερη τιμή, 13,5 μM. Έτσι, μελετήθηκε κινητικά ώστε να βρεθεί το είδος της αναστολής που επιφέρει το *pyrachlostrobin* στο ένζυμο. Ειδικότερα, το shII5 εμφανίζει μικτού τύπου αναστολή έχοντας ως μεταβαλλόμενα υποστρώματα τόσο το CDNB όσο και τη GSH. Επίσης, μελετήθηκε τι είδους μεταβολή επιφέρει στο φθορισμό του ισοενζύμου shII5 κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν. Παρατηρήθηκε πως σχεδόν όλα τα σύμπλοκα ενζύμου-φυτοπροστατευτικού προϊόντος μεταβάλλουν την καμπύλη θερμικής μετατόπισης του shII5, δηλαδή παρουσιάζουν ενίσχυση του φθορισμού. Όμως, το σύμπλοκο με το fluorodifen είναι το μοναδικό που παρουσιάζει το φαινόμενο της απόσβεσης, δηλαδή μείωση της έντασης του φθορισμού. Γι' αυτό το λόγο και μελετήθηκε περαιτέρω. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του fluorodifen (0-50 μM) και από τα αποτελέσματα φάνηκε πως όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υπάρχει στην αντίδραση τόσο αυξάνεται η απόσβεση που παρατηρείται και τόσο μετατοπίζεται η καμπύλη θερμικής μετατόπισης προς τα αριστερά, δηλαδή μειώνεται το σημείο τήξεως του συμπλόκου. Τέλος, φαίνεται ότι η σχέση μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης του φθορισμού και της συγκέντρωσης του fluorodifen καθώς και η σχέση μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης του φθορισμού και του σημείου τήξεως (T_m) που παρουσιάζει κάθε καμπύλη εμφανίζει γραμμική εξάρτηση, γεγονός που υποδηλώνει πως το φαινόμενο παρουσιάζει κάποια βιολογική

σημασία. Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε πιθανότατα να χρησιμοποιηθεί για την οπτική ανίχνευση φυτοφαρμάκων. Επιπλέον, μελετήθηκε η θερμική μετουσίωση των ισοενζύμων με διαφορική φασματοσκοπία φθορισμού. Παρατηρήθηκε πως το σημείο τήξεως των ισοενζύμων δε μετατοπίζεται με την αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης (66,3 °C για το *GmGSTU4-4*, 75,1 °C για το *sh4* και 73,6 °C για το *shII5*).

Ο φθορισμός είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων που εμφανίζεται σε ορισμένα μόρια που ονομάζονται φθοροφόρα ή φθορίζουσες χρωστικές. Ένας φθορίζων ανιχνευτής είναι ένα φθοροφόρο σχεδιασμένο για να εντοπίζεται μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός βιολογικού δείγματος ή για να ανταποκριθεί σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα (Deochand *et al.*, 2016). Υπάρχουν τρία αμινοξέα με εγγενείς ιδιότητες φθορισμού. Η φαινυλαλανίνη (Phe), η τυροσίνη (Tyr) και η τρυπτοφάνη (Trp) αλλά μόνο η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη χρησιμοποιούνται πειραματικά επειδή οι κβαντικές τους αποδόσεις (εκπεμπόμενα φωτόνια/εξερχόμενα φωτόνια) είναι αρκετά υψηλές ώστε να δώσουν ένα καλό σήμα φθορισμού (Jiang *et al.*, 2015). Επομένως, χρησιμοποιείται ο φθορισμός μόνο σε πρωτεΐνες που έχουν είτε Trp είτε Tyr ή και τα δύο. Σε μήκος κύματος 280 nm θα διεγερθούν και τα δύο αμινοξέα, Trp και Tyr, (Stull *et al.*, 2016). Αν θέλουμε να διεγερθεί μόνο η Trp, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μήκος κύματος 295 nm. Αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατανόηση του ξεδιπλώματος της πρωτεΐνης επειδή οι ιδιότητες του φθορισμού τους (κβαντικές αποδόσεις) είναι ευαίσθητες στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται και αλλάζουν όταν διπλώνεται/ξεδιπλώνεται η πρωτεΐνη (Schulze *et al.*, 2016). Σε μια φυσική διαμόρφωση πρωτεΐνης, η Trp και η Tyr βρίσκονται γενικά μέσα στον πυρήνα της πρωτεΐνης, ενώ σε μια μερικώς διπλωμένη κατάσταση, εκτίθενται στο διαλύτη. Σε ένα υδρόφοβο περιβάλλον, η Tyr και η Trp έχουν υψηλή κβαντική απόδοση και κατά συνέπεια υψηλή ένταση φθορισμού (Kalita *et al.*, 2016). Σε αντίθεση με ένα υδρόφιλο περιβάλλον όπου μειώνεται η κβαντική τους απόδοση οδηγώντας σε χαμηλή ένταση φθορισμού. Όσο αναφορά στο κατάλοιπο της Trp, το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής της θα διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον που βρίσκεται (Li *et al.*, 2015).

Υπάρχουν διάφορα μέσα για να ξεδιπλωθεί μια πρωτεΐνη. Οι πιο συνηθισμένοι τρόποι είναι οι χαστροπικοί παράγοντες (ουρία, υδροχλωρίδιο του γουανιδίου), η αλλαγή του pH (οξύ, βάση) και η άνοδος της θερμοκρασίας (Kao *et al.*, 2016). Στη συγκεκριμένη

διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας (αποδιατακτικός παράγοντας) στα ισοένζυμα. Η χημική μετουσίωση με έναν αποδιατακτικό παράγοντα όπως η ουρία είναι ένας από τους κύριους τρόπους για την αξιολόγηση της σταθερότητας των πρωτεϊνών (Timasheff *et al.*, 2002). Παρά τη διαδεδομένη χρήση της, η μοριακή βάση κατά την οποία η ουρία μπορεί να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες παραμένει άγνωστη. Η ουρία μπορεί να ασκεί άμεσα την επίδρασή της, δεσμεύοντας την πρωτεΐνη, ή έμμεσα, μεταβάλλοντας το περιβάλλον του διαλύτη (Courtenay *et al.*, 2001). Οι περισσότερες εκδοχές του μοντέλου άμεσης αλληλεπίδρασης προτείνουν ότι η ουρία δεσμεύεται και σταθεροποιεί την μετουσιωμένη κατάσταση, ευνοώντας έτσι το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης. Αυτή η ερμηνεία όμως δεν εξηγεί πως η πρωτεΐνη ξεπερνά το κινητικό φράγμα για να ξεδιπλωθεί (Schellman *et al.*, 2002). Η ουρία θα μπορούσε να δεσμεύσει την πρωτεΐνη και να ανταγωνιστεί με τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των α-ελίκων και των β-ελασμάτων, συμμετέχοντας έτσι ενεργά στη διαδικασία ξεδιπλώματος. Εναλλακτικά, έχει προταθεί η θεωρία ότι η ουρία δρα έμμεσα μεταβάλλοντας το περιβάλλον του διαλύτη, ελαττώνοντας έτσι το υδρόφοβο δυναμικό της πρωτεΐνης διευκολύνοντας έτσι την έκθεση των αμινοξέων στον υδρόφοβο πυρήνα (Felitsky *et al.*, 2003). Το *GmGSTU4-4* φαίνεται πως επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με τα άλλα δύο ισοένζυμα. Μόλις 2,2 M ουρίας απαιτούνται για να επιφέρουν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου στο μισό της. Αντίθετα, τα άλλα δύο ισοένζυμα, *sh4* και *shII5*, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή στη συγκεκριμένη καταπόνηση.

Κεφάλαιο 4

*Μελέτη και χαρακτηρισμός
φυτικών GSTs*

4.1 Εισαγωγή

Οι φυτικές GSTs πρωτοανακαλύφθηκαν λίγο μετά το 1970, όταν μια GST από αραβόσιτο αποδείχθηκε ότι είναι υπεύθυνη για τη σύζευξη της χλωρο-S-τριαζίνης με τη GSH, προστατεύοντας έτσι την καλλιέργεια από το ζιζανιοκτόνο (Edwards and Dixon, 2002). Από τότε, έχουν εντοπιστεί πολλές δράσεις των φυτικών GSTs και χαρακτηριστεί τα αντίστοιχα ένζυμα (Sheehan *et al.*, 2001; Cummins *et al.*, 2011).

Οι φυτικές GSTs ανήκουν στην οικογένεια των κυτταροπλασματικών, η οποία μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δώδεκα διαφορετικές κατηγορίες: *tau* (U), *phi* (F), *theta* (T), *zeta* (Z), *lambda* (L), παράγοντας 1B (EF1Bγ), αναγωγή της δεϋδροασκορβικής ρίζας (DHAR), η μεθαξίνη, η δεαλογονάση τετραχλωροϋδροκινόνης (TCHQD), η αιμερυθρίνη (GSTH), η ιώτα (GSTI) και οι γλουταθειονυλ-υδροκινόνη αναγωγάσες (GHRs). Η πλειοψηφία των φυτικών GSTs υπάγεται στις τάξεις *tau* και *phi* (Mohsenzadeh *et al.*, 2011; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017).

Οι *tau* και *phi* τάξεις παρουσιάζουν μια ευρεία εξειδίκευση όσον αφορά στα υποστρώματα που καταλύουν και αυτό ίσως σχετίζεται με το ρόλο που επιτελούν στο αβιοτικό στρες (Jain *et al.*, 2010; Cummins *et al.*, 2011; Govindarajan *et al.*, 2015). Καταλύουν μια πληθώρα αντιδράσεων και μπορούν να αποτοξινώσουν διαφορετικές τάξεις ζιζανιοκτόνων όπως οι τριαζίνες, τα θειοκαρβαμίδια και τα χλωροακετανιλίδια (Chronopoulou *et al.*, 2012, 2014). Για παράδειγμα, οι GSTs της *tau* τάξης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην αποτοξίνωση ζιζανιοκτόνων, όπως το fluorodifen (Axarli *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2014). Επίσης, οι φυτικές GSTs που ανήκουν στις *tau*, *phi* και *theta* τάξεις παρουσιάζουν δράση υπεροξειδάσης και αναγωγάσης οργανικών υδροϋπεροξειδίων σε μονοϋδροξυαλκοόλες (Edwards *et al.*, 2000, Wagner *et al.*, 2002, Chronopoulou *et al.*, 2012, 2014). GSTs με δράση υπεροξειδάσης (GPx) έχουν βρεθεί σε διάφορα φυτικά είδη και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά την οξειδωτική καταπόνηση (Cummins *et al.*, 2011; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Οι φυτικές GSTs με δράση GPx συνεισφέρουν στην άμυνα του φυτού (Moons, 2005; Labrou *et al.*, 2015). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η ανθεκτικότητα των φυτών πιθανόν να οφείλεται στην επερχόμενη αύξηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης GSH (GSSG) στα κύτταρα, η οποία λειτουργεί ως σήμα ενεργοποίησης άλλων προστατευτικών μηχανισμών (Circu and Aw, 2008; Mohsenzadeh *et al.*, 2011).

Οι φυτικές GSTs μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη GSH ως δεύτερο υπόστρωμα και καταλύουν μια ποικιλία από αντιδράσεις, όπως οι ισομεριώσεις (Dixon *et al.*, 2002a, b; Edwards *et al.*, 2011; Mohsenzadeh *et al.*, 2011). Επίσης, μπορούν να εκτελούν μη καταλυτικές λειτουργίες ως δεσμευτές ή μεταφορείς πρωτεϊνών για φυτοχημικά μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων, ενώ πρόσφατα έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν ρόλο στην απόπτωση και στη μεταγωγή σημάτων καταπόνησης (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017).

Μια άλλη, σημαντική, λειτουργία που παρουσιάζουν οι φυτικές GSTs είναι ότι μπορούν να συνδέουν σε μια περιοχή του μορίου τους (L-θέση) υδρόφοβα μόρια, όπως η αίμη και τα φλαβονοειδή (Dixon *et al.*, 2008, 2011, Axarli *et al.*, 2009, Mannervik *et al.*, 2012, Mashiyama *et al.*, 2014). Οι GSTs με την παραπάνω λειτουργία είναι αυτές που εμπλέκονται στη μεταφορά ανθοκυανινών, φλαβονοειδών, οξυλιπινών και φαινολικών καθώς και στη μεταφορά ορμονών όπως η αυξίνη και η κυτοκίνη από ένα μέρος του κυττάρου σε ένα άλλο (Dixon *et al.*, 2008, 2011, Axarli *et al.*, 2009). Η L-θέση διαφέρει μεταξύ των GSTs. Για παράδειγμα στην περίπτωση του *Arabidopsis thaliana* βρίσκεται δίπλα στη G-θέση (Reinemer *et al.*, 1996) ενώ στην περίπτωση του *GmGSTU4-4* βρίσκεται σε μια υδρόφοβη τσέπη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, που αποτελείται από συντηρημένα κατάλοιπα (Axarli *et al.*, 2009).

Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα μεταγραφής των φυτικών GSTs αυξάνονται κατά τη διάρκεια βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Στους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης περιλαμβάνονται τα διάφορα παθογόνα (μύκητες, βακτήρια, ιοί), εχθροί (έντομα, ζώα, πουλιά), αλλά και άλλα φυτά τα οποία δρουν ανταγωνιστικά των καλλιεργούμενων φυτών (παράσιτα, ζιζάνια) ή συμβιώνουν με τα καλλιεργούμενα φυτά (Moons, 2005; Edwards *et al.*, 2011). Επαγωγή GST γονιδίων μπορούν να προκαλέσουν η ακτινοβολία, τα βαρέα μέταλλα, η θερμοκρασία, η οξειδωτική καταπόνηση, τα ζιζανιοκτόνα και άλλα (Kilili *et al.*, 2004; Labrou *et al.*, 2015).

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Υλικά

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Το λυοφιλωμένο cDNA, από τα πράσινα μέρη του φυτού *Glycine max*, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την ενίσχυση του γονιδίου *GmGSTU5-5* καθώς και τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων του *Phaseolus vulgaris*, ήταν προσφορά του Δρ. Π. Μάδεση (INEB, Θεσσαλονίκη).

4.2.2 Μέθοδοι

4.2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για ενίσχυση cDNA

Η ενίσχυση του *GmGSTU5-5* πραγματοποιήθηκε με την ακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση υψηλής πιστότητας (High Fidelity) για την ελαχιστοποίηση των λαθών κατά την αντιγραφή. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
2x διάλυμα αντίδρασης	25
dNTPs (50 mM)	0,5
5' GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATG TCT AAA AGC GAA GAC TTG AAG CTT TTG GGG 3' (10 pmol/μL)	1
5' GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATG TCT AAA AGC GAA GAC TTG AAG CTT TTG GGG 3' (10 pmol/μL)	1
Accura High-Fidelity πολυμεράση	1
cDNA	5
Δις απιονισμένο νερό	16,5
Τελικός όγκος	50

Οι θερμοκύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι οι ακόλουθοι:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 94 °C για 30 s
<i>25 κύκλοι</i>	Αποδιάταξη στους 94 °C για 45 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 65 °C για 15 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1 % και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.

4.2.2.2 Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a με πλασμιδιακό DNA για τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2

Για το μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε 100 μ L δεκτικών κυττάρων προστίθενται 2 μ L πλασμιδιακού DNA PnGSTU8.1 ή PnGSTU8.2. Αφού αναμιχθούν με ήπιο τρόπο, το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων με επώασή τους στους 42 °C για 90 s και έπειτα αφήνονται στον πάγο για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μ L θρεπτικού μέσου LB και το μίγμα αφού αναμιχθεί καλά επωάζεται στους 37 °C για 1 h. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντριση στις 2.000 rpm για 2 min προκειμένου να συγκεντρωθούν τα κύτταρα σαν ίζημα στο φιαλίδιο τύπου erpendorf. Αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και προστίθεται περίπου 80-100 μ L φρέσκου θρεπτικού μέσου (LB) όπου και επαναδιαλύονται με ήπιο τρόπο τα κύτταρα. Η ποσότητα αυτή του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, όπου υπάρχει και ως μέσο επιλογής η αμπικιλίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στη συνέχεια στους 37 °C για 12-16 h.

4.2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και προσδιορισμός αλληλουχίας ισοενζύμου

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, του οίκου *Macherey–Nagel*. Αλληλουχίστηκε από την εταιρεία MWG Biotech AG. Κατόπιν ακολούθησε μετασηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με την § 2.2.3 που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

4.2.2.4 Ετερολόγη έκφραση φυτικών ισοενζύμων σε βακτήρια *E. coli* του στελέχους BL21(DE3)

Για την έκφραση των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* μετασχηματίστηκαν κύτταρα από τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* BL21 (DE3). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν: 1 % (w/v) πεπτόνη, 1 % (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50 mL) προσθέτουμε ως αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη (100 mg/mL) για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEXP5-CT/TOPO[®] καθώς και ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37 °C για 14-16 h υπό συνεχή ανάδευση, στις 180 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 μL σε φιαλίδια τύπου erpedorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500 μL διάλυμα γλυκερόλης 50 % (v/v). Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί ωσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80 °C. Μετά το πέρας, προστίθεται το αντίστοιχο αντιβιοτικό στη μεγάλη κωνική (450 mL), εμβολιάζεται με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας και τοποθετείται στον επωαστήρα, στους 37 °C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) (1 mM) όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών είναι 0,6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4 h. Έπειτα, μεταφέρεται η καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να γίνει η συλλογή της πάστας με φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4 °C για 20 min.

4.2.2.5 Καθαρισμός φυτικών ισοενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας

Επαναιωρούμε τα κύτταρα της κυτταρικής 'πάστας' σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (KH₂PO₄, 20 mM, pH 7) και λύνονται τα κύτταρα με χρήση υπερήχων έχοντας εμβαπτισμένο το κυτταρικό αιώρημα σε παγόλουτρο. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το επιθυμητό γονίδιο χρειάστηκαν τέσσερις έως πέντε επαναλήψεις των 10 s η καθεμία για τη λύση των κυττάρων. Φυγοκεντρούμε το τελικό αιώρημα στις 13.000 rpm για 15 min και συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια προσδιορίζουμε φωτομετρικά την ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH (§ 2.2.15), ως επίσης και τη συνολική πρωτεΐνη (μέθοδος Bradford) (§ 2.2.14). Ακολούθησε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου

φωσφορικού καλίου (συγκέντρωσης 20 mM, pH 7) για 18-24 h και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο (§ 2.2.13) Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της ενζυμικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % SDS-PAGE), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.21).

4.2.2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bradford που περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.14.

4.2.2.7 Προσδιορισμός της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* με ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα και με ανάλογα γλουταθειόνης

Για τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4 δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl) καθώς και το fluorodifen χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένες μέθοδοι (Axarli *et al.* 2009a, Skopelitou *et al.* 2011), οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά σε παραγράφους προηγούμενου κεφαλαίου (§ 2.2.26 και 2.2.33). Προσδιορισμός της δράσης υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε με φωτομετρικές δοκιμές με υδρο-υπεροξειδία (CuOOH, tert-BuOOH, benzoyl peroxide) οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στην § 2.2.27. Οι δοκιμές για 2-2 διθειοδιαιθανόλη (HED), διϋδροασκορβικό οξύ, αιθακρινικό οξύ (EA), trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, βρωμοσουλφοφθαλεΐνη, trans-2 ενενάλη, και ισοθειοκυανικών εστέρων (PEITC και AITC) περιγράφονται αναλυτικά στις § 2.2.28, 2.2.29, 2.2.30, 2.2.31, 2.2.32.

Για να αξιολογηθούν διάφορες ενώσεις ως δυνητικοί αναστολείς των GST ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε ενζυμικός προσδιορισμός με το σύστημα CDNB/GSH παρουσία ή απουσία των ενώσεων. Χρησιμοποιούνται κυψελίδες μάρτυρες και δείγματος. Αρχικά, στις κυψελίδες προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, προσθέτουμε το CDNB, τη GSH και την ένωση. Τέλος, ανακινούμε και προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προέκυψαν από τουλάχιστον δύο επαναλήψεις.

4.2.2.8 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου *GmGSTU5-5*

Η αλληλεπίδραση μετρήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της αναστολής των ενζύμων από τις επιλεγμένες ενώσεις, αφού η πρόσδεση υποκαταστατών στην L-θέση των GSTs μεταβάλλει την καταλυτική δραστηριότητα (Labrou *et al.*, 2015).

Μελετήθηκε η αναστολή διαφορετικών φυσικών ενώσεων [ελλαγικό οξύ, (\pm)-ταξιφολίνης, (\pm)-ναρινενίνη, (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα, κερσετίνη, ρεσβερατρόλη, κουρκουμίνη, πιπερολγουμίνη, πολυδατίνη, σαφρανάλη, γαλλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ] έναντι του *GmGSTU5-5*. Δοκιμάστηκαν σε τελική συγκέντρωση 100 μ M. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα CDNB/GSH.

4.2.2.9 Κινητική μελέτη φυτικών ισοενζύμων για το σύστημα CDNB/GSH

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, GSH σε σταθερή συγκέντρωση και CDNB μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 14 - 2.310 μ M για το *GmGSTU5-5*, 15 - 2.310 μ M για το *PvGSTU8.1* και 6 - 2.310 μ M για το *PvGSTU8.2*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης

συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M , pH 6,5 , CDNB σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 2 nM - 3.000 μM για το *GmGSTU5-5*, 10 - 3.500 μM για το *PnGSTU8.1* και 2 - 3.000 μM για το *PnGSTU8.2*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

4.2.2.10 Κινητική μελέτη φυτικών ισοενζύμων για το σύστημα NBD-chloride/GSH

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας το NBD-Cl ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας το NBD-Cl ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το NBD-Cl ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 , GSH σε σταθερή συγκέντρωση και NBD-Cl μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 7,5 - 3.500 μM για *GmGSTU5-5*, 5 - 2.400 μM για το *PnGSTU8.1* και 7,5 nM - 2.250 μM για το *PnGSTU8.2*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης

συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 , NBD-Cl σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 10 - 4.000 μ M για το *GmGSTU5-5*, 10 - 3.000 μ M για το *PvGSTU8.1* και 5 nM - 7.500 μ M για το *PvGSTU8.2*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

4.2.2.11 Κινητική μελέτη των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* για το σύστημα BDNB/GSH

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 , GSH σε σταθερή συγκέντρωση και BDNB μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 37.5 - 1.680 μ M για το *PvGSTU8.1* και 20 - 1.260 μ M για το *PvGSTU8.2*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν

στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 , BDNB σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 20 - 3.500 μ M για το PnGSTU8.1 και 5 - 4.000 μ M για το PnGSTU8.2. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

4.2.2.12 Κινητική μελέτη του GmGSTU5-5 για το σύστημα CuOOH/GSH

Κινητική μελέτη του GmGSTU5-5 έχοντας CuOOH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του ισοενζύμου GmGSTU5-5 (§ 2.2.35), έχοντας το CuOOH, ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το CuOOH, ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 , GSH σε σταθερή συγκέντρωση και CuOOH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 100 - 3.500 μ M για το GmGSTU5-5. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη των ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του ισοενζύμου GmGSTU5-5 (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου

φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, CuOOH, σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 130 - 2.500 μ M για το *GmGSTU5-5*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

4.2.2.13 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης για των GSTU ισοένζυμων

Μελετήθηκε η εξάρτηση της καταλυτικής δραστηριότητας των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* σε θερμοκρασιακό εύρος που κυμαινόταν από τους 4 °C έως 85 °C.

Για τη μελέτη αυτή, καθαρίστηκαν τα ισοένζυμα με χρωματογραφία συγγένειας και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 0,1 M και pH 6,5. Αναλυτικότερα, η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την επώαση κατάλληλου ενζυμικού δείγματος για χρονικό διάστημα 5 min σε επιλεγμένες θερμοκρασίες εντός του προαναφερθέντος θερμοκρασιακού εύρους και στη συνέχεια, τον προσδιορισμό της παραμένουσας δραστηριότητας του ενζύμου χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH, όπου περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.15. Η δραστηριότητα στους 4 °C θεωρήθηκε ως το 100 % ώστε να προσδιοριστεί η δραστηριότητα για τις άλλες θερμοκρασίες.

Η ανάλυσή της έγινε μέσω της σχέσης *Arrhenius* (3.1). Ως δεδομένα χρησιμοποιήσαμε αυτά της § 4.2.2.13, όπου η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας με το σύστημα GSH/CDNB σε θερμοκρασιακό εύρος 0 - 85 °C.

4.2.2.14 Επίδραση pH και θερμοκρασίας στην ταχύτητα αντίδρασης των GSTU ισοενζύμων

Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από το pH εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας με το σύστημα CDNB/GSH σε εύρος pH 5 - 5,8 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως 0,1 M και όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M

ενώ σε εύρος pH 6 - 8 σε ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M, δισόξινου φωσφορικού νατρίου 0,2 M.

4.2.2.15 Θερμική δοκιμασία μετατόπισης (protein thermal shift assay) για το *GmGSTU5-5*

Η θερμική δοκιμασία μετατόπισης έγινε με τη συσκευή STEP ONE StepOne™ System της Applied Biosystems®. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ελέγχθηκε η εξάρτηση του σημείου τήξεως της πρωτεΐνης σε σχέση με τη διαφορετική ποσότητα αυτής. Η μέτρηση διεξήχθη σε εύρος θερμοκρασιών 4 °C - 99 °C με βήμα 1 % με πρώτο στάδιο 2 min στους 4 °C (100 %) σε standard πρωτόκολλο. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις πρωτεΐνης: 0 μg, 0,9 μg, 1,62 μg, 2,63 μg και 3,5 μg σε τελικό όγκο 12,5 μL. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (5 μL) μαζί με κατάλληλη χρωστική (2,5 μL).

4.2.2.16 Προσδιορισμός της % αναστολής των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* από ξενοβιοτικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των ισοενζύμων κατά την έκθεσή τους σε ξενοβιοτικές ενώσεις, εκτιμάται η δραστηριότητα του καθ' ενός με το σύστημα CDNB/GSH στους 37 °C. Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο § 2.2.37. Η αντίδραση μελετήθηκε φωτομετρικά υπολογίζοντας την ταχύτητά της στα 340 nm. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις ($\Delta A/\Delta t$) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αντίστοιχης παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (% Remaining Activity, RA) και, από αυτήν, της ενζυμικής αναστολής (% Enzyme Inhibition, EI). Οι μετρήσεις απουσία αναστολέα ($\Delta A/\Delta t$)₀ θεωρήθηκε ως 100 % RA και 0 % EI. Οι τιμές RA καθώς και EI υπολογίσθηκαν ως εξής :

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

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

4.2.2.17 Ανάλυση δομής του ισοενζύμου *GmGSTU5-5*

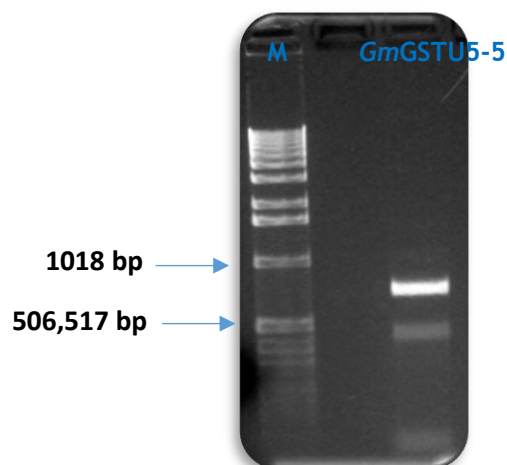
Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη δομή του ισοενζύμου πραγματοποιήθηκε μοριακή μοντελοποίηση με το πρόγραμμα SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 2009). Η κρυσταλλική δομή που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για τη μοντελοποίηση του *GmGSTU5-5* ήταν αυτή με κωδικό PDB 5g5e. Η ποιότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε με τη χρήση

βαθμολογίας Global Model Quality Estimation και QMEAN. Τα προγράμματα PyMOL (www.pymol.org) και UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση της δομής του ισοενζύμου. Ο διακομιστής CastP χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των υποθετικών τσεπών (Dundas et al., 2006). Τα προγράμματα PYMOL, HPC@NIH και WHAT IF χρησιμοποιήθηκαν για να κατανοηθούν καλύτερα οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες των ενζύμων.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση cDNA του *GmGSTU5-5*

Για την ενίσχυση του cDNA του *GmGSTU5-5* πραγματοποιήθηκε PCR. Αρχικά, έγινε σύνθεση εκκινητών και ακολούθησε PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου. Ως μήτρα, χρησιμοποιήθηκε λυοφιλωμένο cDNA από καταπονημένους ιστούς *Glycine max* (Εικόνα 4.1). Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στον pETite C-His vector και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 24 h. Έπειτα, επιλέχθηκε εκείνη η αποικία με την καλύτερη ενζυμική δραστηριότητα και αλληλουχίστηκε το πλασμιδιακό DNA έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του γονιδίου.



Εικόνα 4.1: PCR με χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο *GmGSTU5-5*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Τέλος, στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο του ισοενζύμου καθώς και το θεωρητικό μοριακό τους βάρος (Πίνακας 4.1).

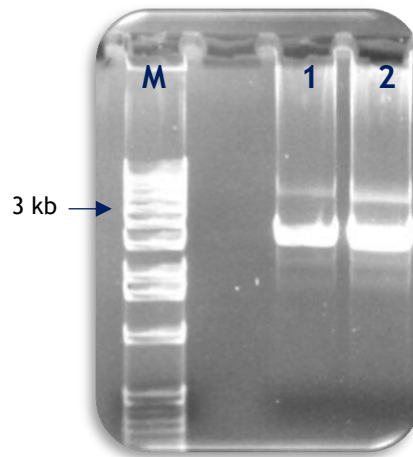
Πίνακας 4.1: Θεωρητικός υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου και μοριακού βάρους με τη χρήση του EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Ένζυμο	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
<i>GmGSTU5-5</i>	5,1	26.643,3

4.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*

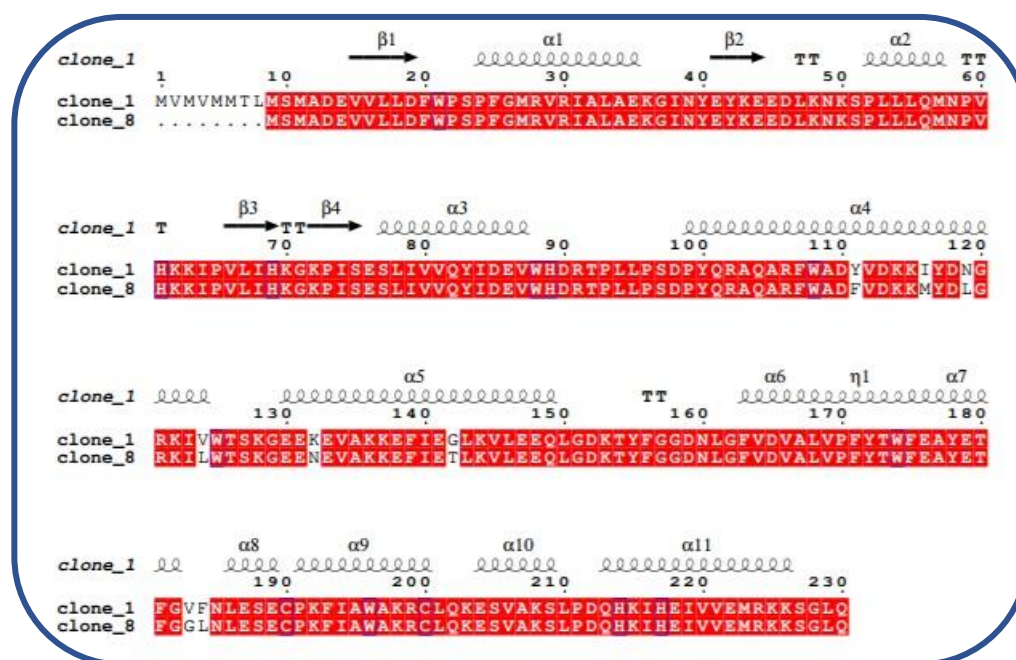
Με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.2), απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τα πλασμίδια pEXP-5CT-*PvGSTU8.1* και pEXP-5CT-*PvGSTU8.2*. Μετά την

ολοκλήρωση της διαδικασίας, το προϊόν κάθε απομόνωσης αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1 % (w/v) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων *PnGSTU8.1* (1) και *PnGSTU8.2* (2) κατόπιν απομόνωσης τους με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης σε πηκτή αγαρόζης (1 % w/v). Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-Log DNA Ladder (Biolabs).

Τα πλασμίδια αλληλουχίστηκαν και αποτελούνται από περίπου 650 bp, αντίστοιχα, κωδικοποιώντας πολυπεπτίδια των 230 και 222 αμινοξέων (Εικόνα 4.3). Παρακάτω παρουσιάζονται, με γραμμική στοίχιση, οι αλληλουχίες των δύο ισοενζύμων σύμφωνα με το πρόγραμμα Clustal Omega.



Εικόνα 4.3: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών μέσω του προγράμματος ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) και ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) των ισοενζύμων *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*.

Παρατηρούμε πως τα δύο ισοένζυμα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα. Διαφέρουν μεταξύ τους μόνο κατά οκτώ αμινοξέα, τα οποία βρίσκονται στη Ν-τελική δομική περιοχή και μεταξύ της α4 και α5 α-έλικας. Αυτά βρίσκονται στις θέσεις 111, 116, 119, 123, 132, 142, 183 και 184. Όλες οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε α-έλικες εκτός από αυτές που βρίσκονται στις θέσεις 183 και 184 που βρίσκονται στο βρόγχο που ενώνει στην α7 α-έλικα με την α8. Επίσης, παρατηρούμε πως το *PnGSTU8.1* αποτελείται από οκτώ επιπλέον αμινοξέα που βρίσκονται στο βρόγχο β1, στην αρχή της C-τελικής δομικής περιοχής. Στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο των ισοενζύμων καθώς και το θεωρητικό μοριακό τους βάρος (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Θεωρητικός υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου και μοριακού βάρους με τη χρήση του EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Ένζυμο	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
<i>PnGSTU8.1</i>	6,3	26.735,1
<i>PnGSTU8.2</i>	6,0	25.766,8

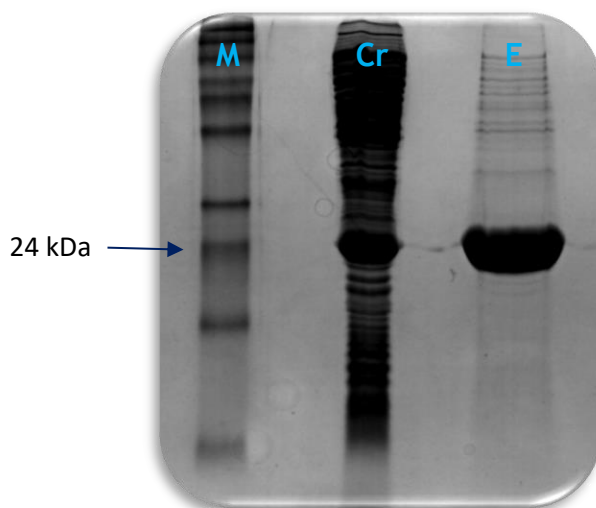
4.3.3 Έκφραση και καθαρισμός των φυτικών ισοενζύμων

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των ισοενζύμων με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* HI Control BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (§ 2.2.3). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C με θρεπτικό μέσο λακτόζης, έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* και την αμικιλίνη για τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*. Μετά το πέρας 24 h κατάλληλη ποσότητα κυττάρων λύεται με τη βοήθεια υπερήχων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προκύπτει, μετά τη φυγοκέντριση, φορτώνεται σε κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας (§ 2.2.13).

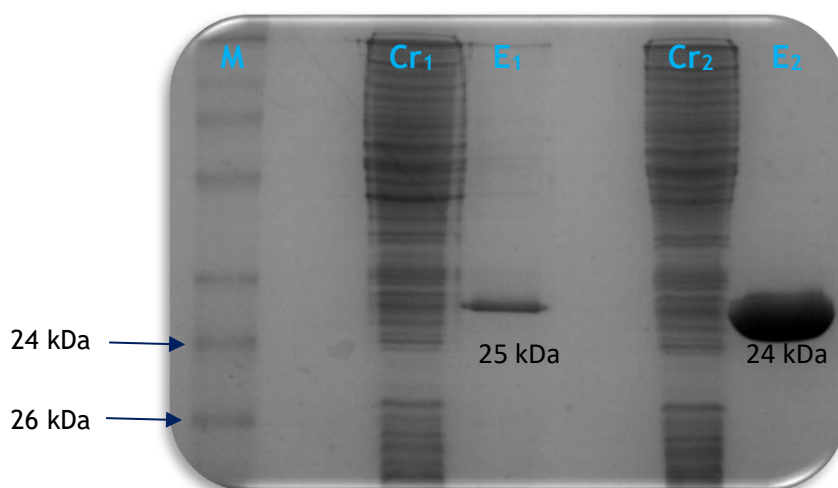
Τα ισοένζυμα *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 115 %, 106 % και 93,5 %, αντίστοιχα (Πίνακας 4.3). Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η καθαρότητα τους (Εικόνα 4.4, 4.5).

Πίνακας 4.3: Απόδοση καθαρισμού από τη χρωματογραφία συγγένειας για κάθε ισοένζυμο.

Ένζυμο	Απόδοση καθαρισμού (%)
<i>GmGSTU5-5</i>	115,0
<i>PvGSTU8.1</i>	106,0
<i>PvGSTU8.2</i>	93,5



Εικόνα 4.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % w/v) παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), Cr: πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) πριν τον καθαρισμό για το *GmGSTU5-5*, E: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το *GmGSTU5-5*.



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % w/v) παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), Cr₁: πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) πριν τον καθαρισμό για το *PvGSTU8.1*, E₁: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το *PvGSTU8.1*, Cr₂: πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) πριν τον καθαρισμό για το *PvGSTU8.2*, E₂: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλυσης για το *PvGSTU8.2*.

4.3.4 Μελέτη της εκλεκτικότητας του ισοενζύμου *GmGSTU5-5*

Το *GmGSTU5-5* μελετήθηκε ως προς την εκλεκτικότητα διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρώματα καθώς και αναλόγων γλουταθειόνης για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν και άλλες δράσεις τους όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή δράση θειολοτρανσφεράσης.

Αναλυτικότερα, το *GmGSTU5-5* εμφανίζει σχετικά περιορισμένη εκλεκτικότητα, καθώς καταλύει εννιά υποστρώματα σε σύνολο δεκαοκτώ. Από τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του, 1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα εκτός από το pNBC. Πιο συγκεκριμένα, το *GmGSTU5-5* παρουσίασε τη μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα με το FDNB σε σχέση με τα υπόλοιπα παράγωγα του νιτροβενζολίου, περίπου 2,5-φορές μεγαλύτερη από το CDNB που αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα για τις GSTs. Αξιοσημείωτη ειδική δραστηριότητα εμφανίζει και το *GmGSTU5-5* έναντι του BDNB, περίπου 1,5-φορές υψηλότερη (Πίνακας 4.4).

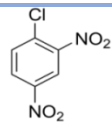
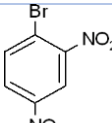
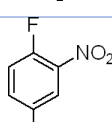
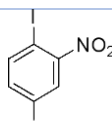
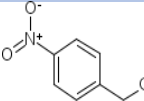
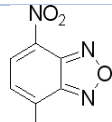
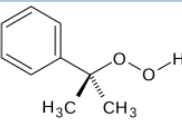
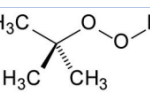
Το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εξετάστηκε επίσης εάν εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου (Πίνακας 4.4). Είναι γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας οξειδωτικής καταπόνησης, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξειδία, μετατρέποντας τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Labrou *et al.*, 2015). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* δεν εμφανίζει υψηλή δράση υπεροξειδάσης. Το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου φαίνεται να μην αποτελεί αποδεκτό υπόστρωμα για το ισοένζυμο ενώ τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου και τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου εμφανίζουν λιγότερη από τη μισή ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το CDNB.

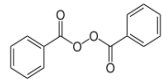
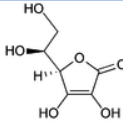
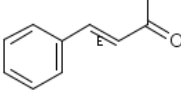
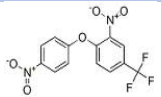
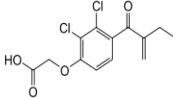
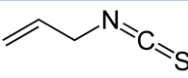
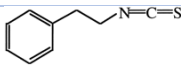
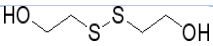

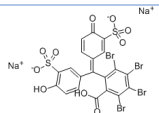
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* καταλύει την αντίδραση προσθήκης της θειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλ-εστέρα). Πιο συγκεκριμένα, το *GmGSTU5-5* εμφανίζει την ίδια περίπου

ειδική δραστηριότητα με τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα όπως και με το πρότυπο υπόστρωμα CDNB ενώ ο ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας δεν αποτελεί υπόστρωμα για το ισοένζυμο. Επιπλέον, το *GmGSTU5-5* εμφανίζει σχετικά υψηλή ειδική δραστηριότητα με το 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο ενώ σχεδόν μηδενική έχοντας ως υπόστρωμα το αιθακρινικό οξύ.

Στον παρακάτω Πίνακα εμφανίζεται η *ειδική δραστηριότητα (%)* την οποία παρουσίασε το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* έναντι των διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4: Ειδική δραστηριότητα (%) του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* ως προς διαφορετικά ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστηριότητα που εμφάνισε το *GmGSTU5-5* έναντι του CDNB.

Υπόστρωμα	Δομή	<i>GmGSTU5-5</i>
1-χλωρο-4,δινιτροβενζόλιο		100
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο		133,3
1-φθορο-2,4δινιτροβενζόλιο		227,8
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο		16,7
π-νιτροβενζυλχλωρίδιο		0
4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο		83,3
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου		35,6
τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο		47,8

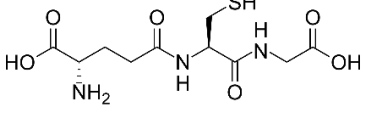
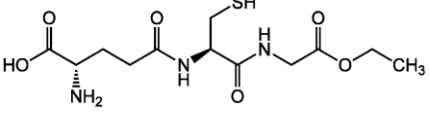
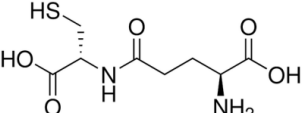
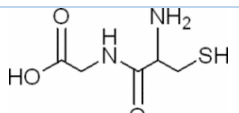
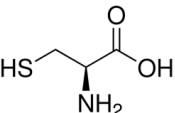
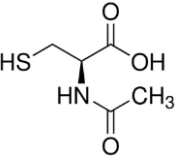
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο		0
διϋδροασκορβικό οξύ		0
trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη		0
Fluorodifen		0
Αιθακρινικό οξύ		5,5
Ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας		0
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας		105,5
2-2διθειοδιαιθανόλη		0
trans-2-ενενάλη		0
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη		0

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα ανάλογα γλουταθειόνης ως πιθανά υποστρώματα του ισοενζύμου *GmGSTU5-5*, πραγματοποιήθηκε ενζυμικός προσδιορισμός με CDNB. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου *GmGSTU5-5* εμφανίζεται υψηλότερη με τη GSH, παρά με τα άλλα υποστρώματα θειόλης (Πίνακας 4.5), υποδηλώνοντας ότι η GSH προτιμάται έναντι των άλλων πέντε αναλόγων ως συν-υπόστρωμα θειόλης. Οι πρώτες μελέτες έχουν δείξει ότι η G-θέση είναι εξαιρετικά συντηρημένη και εξειδικευμένη για την GSH, ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι και άλλα ανάλογα GSH μπορούν να δεσμευτούν στη G-θέση, αν και με χαμηλότερη συγγένεια και καταλυτική αποτελεσματικότητα (Chini *et al.*, 2017). Γενικά, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εμφάνισε ευρεία εκλεκτικότητα καθώς έδειξε καταλυτική δράση με όλα τα ανάλογα θειόλης, συμπεριλαμβανομένων των διπεπτιδίων κυστεΐνης γ -Glu-Cys και Cys-Gly καθώς

επίσης και το αμινοξύ L-Cys και το ανάλογο του N-ακετύλιο -L-κυστεΐνη (Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5: Ειδική δραστικότητα του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* έναντι αναλόγων GSH. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστικότητα που εμφάνισε το *GmGSTU5-5* έναντι της GSH.

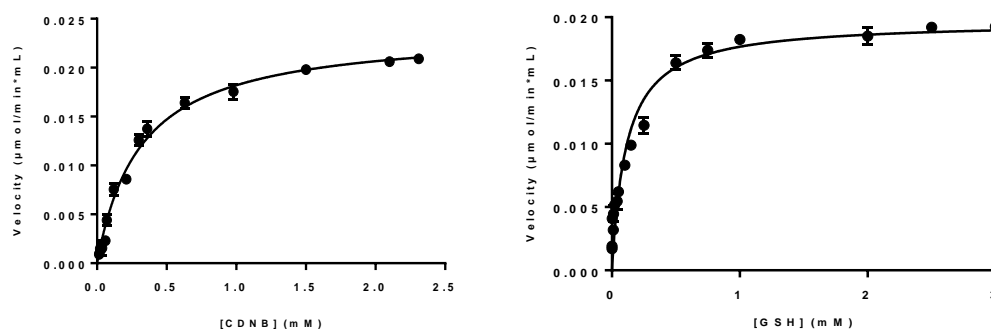
Υπόστρωμα	Δομή	Ενζυμική δραστικότητα (%)
GSH		100
GSH ethyl ester		62,8
γ -Glu-Cys		5,7
Cys-Gly		21,1
Κυστεΐνη		11,4
N-Ακετύλιο-L-κυστεΐνη		28,5

4.3.5 Κινητική ανάλυση του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* ως προς τα υποστρώματα CDNB, CuOOH και NBD chloride

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το υπόστρωμα CDNB και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι K_m και k_{cat} (Πίνακας 4.6). Το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* υπακούει στην εξίσωση κινητικής των *Michaelis Menten* και ως προς τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 4.6). Η τιμή της K_m και της k_{cat} για το CDNB και τη GSH, είναι μέσα στο εύρος τιμών των φυτικών GSTs (Labrou *et al.* 2004; Axarli *et al.* 2009a, b).

Σχετικά με το CuOOH, παρατηρείται η ίδια εικόνα. Όταν χρησιμοποιήθηκε το CuOOH ως μεταβλητό υπόστρωμα με τη συγκέντρωση της GSH σταθερή και το αντίστροφο, παρατηρήθηκε ότι το *GmGSTU5-5* υπακούει στην εξίσωση των *Michaelis Menten* και για τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 4.7). Η τιμή της K_m του *GmGSTU5-5* τόσο για το CuOOH όσο και για τη GSH, εμφανίζεται να είναι 0,9 mM, σχετικά υψηλή σε σχέση με τις τιμές που παρουσιάζουν οι φυτικές GSTs (Axarli *et al.* 2009a). Επίσης, το ίδιο συμβαίνει και με την τιμή της σταθερά εξειδίκευσης (Πίνακας 4.7).

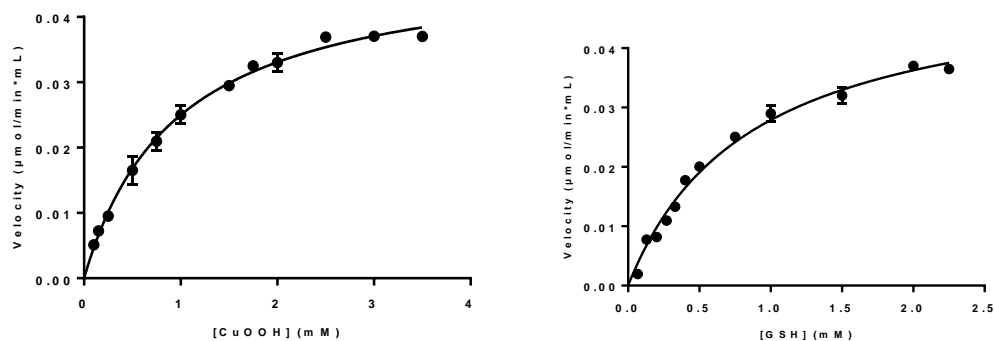
Όσον αφορά στο NBD-chloride και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι το *GmGSTU5-5* υπακούει στην εξίσωση των *Michaelis Menten* και για τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 4.8). Η τιμή της K_m του *GmGSTU5-5* για το NBD-chloride και τη GSH, είναι μικρή γεγονός που υποδηλώνει την υψηλή συγγένεια με τα υποστρώματα.



Εικόνα 4.6: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5*.

Πίνακας 4.6: Κινητικές σταθερές για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* για το σύστημα CDNB/GSH.

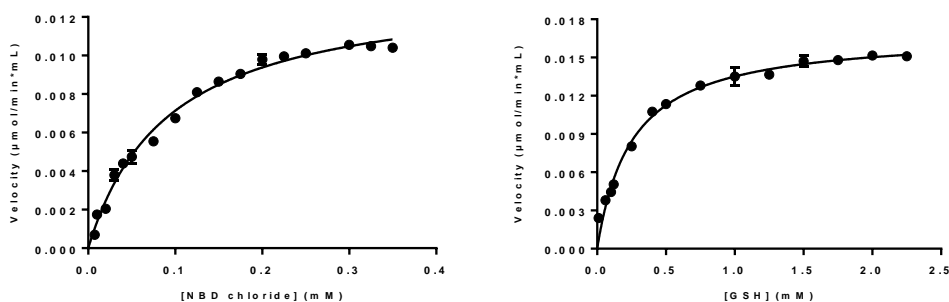
ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	CDNB	GSH
	<i>GmGSTU5-5</i>	
K_m (mM)	0,3 ± 0,03	0,1 ± 0,01
k_{cat} (min ⁻¹)	313,2 ± 11,2	



Εικόνα 4.7: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5*.

Πίνακας 4.7: Κινητικές σταθερές για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* για το σύστημα CDNB/NBD chloride.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	CuOOH	GSH
	<i>GmGSTU5-5</i>	
K_m (mM)	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
k_{cat} (min^{-1})	$0,2 \pm 0,01$	



Εικόνα 4.8: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5*.

Πίνακας 4.8: Κινητικές σταθερές για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* για το σύστημα NBD-chloride /GSH.

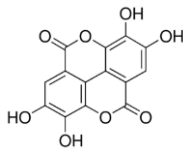
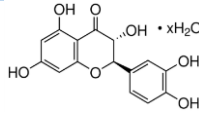
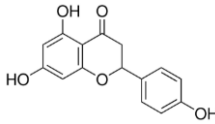
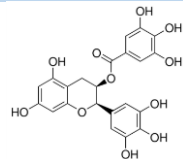
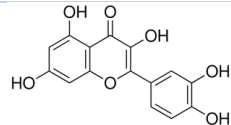
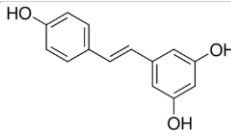
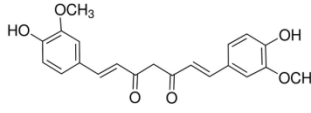
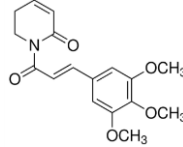
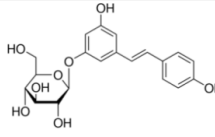
ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	NBD-chloride	GSH
	<i>GmGSTU5-5</i>	
K_m (mM)	$0,1 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,02$
k_{cat} (min^{-1})	$0,5 \pm 0,01$	

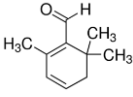
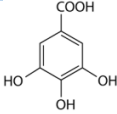
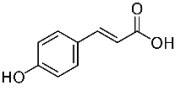
4.3.6 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων του ισοενζύμου *GmGSTU5-5*

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.9, το *GmGSTU5-5* είναι ικανό να δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων. Μεταξύ όλων των φυσικών προϊόντων, η κερσετίνη εμφανίζει την υψηλότερη ισχύ παρεμπόδισης και ακολουθεί η ρεσβερατρόλη, το

ελλαγικό οξύ, η κουρκουμίνη, η πολυδατίνη και η σαφρανάλη. Επίσης, μέτρια ισχύ παρουσιάζουν η (\pm)-υδρο-ταξφολίνη, η (\pm)-ναριγενίνη, η (-)-επιγαλλοκατεχίνη και η πιπερλονγκουμίνη. Τέλος, το *GmGSTU5-5* δεν εμφανίζει καμμία παρεμπόδιση με το π-κουμαρικό και το γαλλικό οξύ.

Πίνακας 4.9: Υπολειπόμενη ενζυμική δραστηριότητα των φυσικών προϊόντων έναντι του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH.

Αναστολείς	Δομή	Υπολειπόμενη δραστηριότητα (%)
Ελλαγικό οξύ		30,1
(\pm)-Υδρο-ταξφολίνη		43,4
(\pm)-Ναριγενίνη		60,0
(-)-Επιγαλλοκατεχίνη gallate		64,3
Κερσετίνη		11,4
Ρεσβερατρόλη		23,8
Κουρκουμίνη		32,0
Πιπερλονγκουμίνη		55,3
Πολυδατίνη		30,0

Σαφρανάλη		33,3
Γαλλικό οξύ		94,0
π-κουμαρικό οξύ		98,0

4.3.7 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*

Τα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* μελετήθηκε ως προς την εκλεκτικότητα διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν και άλλες δράσεις τους όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή δράση θειολοτρανσφεράσης.

Ειδικότερα, τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* καταλύουν μια πληθώρα αντιδράσεων, δηλαδή δεκαπέντε από τα δεκαοκτώ υποστρώματα. Από τα παράγωγα του νιτροβενζολίου που δοκιμάστηκαν, το 1χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του, 1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο, αποτέλεσαν αποδεκτά υποστρώματα σχεδόν όλα εκτός από το FDNB για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*. Πιο συγκεκριμένα, για το *PnGSTU8.1* καλύτερο υπόστρωμα φαίνεται να είναι το BDNB (εμφανίζει 2,5-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*) ενώ για το *PnGSTU8.2* το pNBC (εμφανίζει 32,5-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το *PnGSTU8.1*) (Πίνακας 4.10).

Τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* εξετάστηκαν επίσης για το εάν εμφανίζουν δράση υπεροξειδάσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου (Πίνακας 4.10). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* δεν εμφανίζουν αξιόλογη δράση υπεροξειδάσης.

Τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* να καταλύουν την αντίδραση προσθήκης της θειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας. Πιο συγκεκριμένα, το *PnGSTU8.2* εμφανίζει σχεδόν διπλάσια ειδική δραστηριότητα με τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα σε σχέση με το *PnGSTU8.1*.

Επίσης, το PnGSTU8.2 φαίνεται να παρουσιάζει 1450-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα έναντι του ισοθειοκυανικού αλλυλεστέρα σε σχέση με το PnGSTU8.1 (Πίνακας 4.10). Το PnGSTU8.1 εμφανίζει σχετικά υψηλή ειδική δραστικότητα με το 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο ενώ σχεδόν μηδενική έχοντας ως υπόστρωμα το αιθακρινικό οξύ. Τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2 εμφανίζουν καταλυτική δράση έναντι της 2,2 διθειοδιαιθανόλης, με το PnGSTU8.1 να παρουσιάζει 45-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με το PnGSTU8.2. Τέλος, το PnGSTU8.2 εμφανίζει υψηλή ειδική δραστικότητα με το fluorodifen και το αιθακρινικό οξύ σε σχέση με το PnGSTU8.2 που εμφανίζει σχεδόν μηδενική.

Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζεται η ειδική δραστικότητα (%) την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2 έναντι των διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Πίνακας 4.10).

Πίνακας 4.10: Ειδική δραστικότητα (%) των ισοενζύμων PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2, ως προς ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστικότητα που εμφάνισαν τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2 έναντι του CDNB.

Υπόστρωμα	PnGSTU8.1	PnGSTU8.2
1-χλωρο-2,4δινιτροβενζόλιο	100	100
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο	116,7	89,5
1-φθορο-2,4δινιτροβενζόλιο	0,07	0
1-ιοδω-2,4-δινιτροβενζόλιο	1,3	10,5
π-νιτροβενζυλχλωρίδιο	6,7	68,4
4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο	60	68,5
υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου	0	2,1
τ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο	3,3	0,2
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο	0,3	0,01
διϋδροασκορβικό οξύ	133,3	0

trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη	3,3	0,2
Fluorodifen	0	78,9
Εθακρινικό οξύ	3,3	47,4
ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας	0,1	61,1
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας	23,3	16,8
2-2διθειοδιαιθανόλη	443,3	3,1
trans-2-ενενάλη	0	0,1
βρωμοσουλφοφθαλεΐνη	0	0

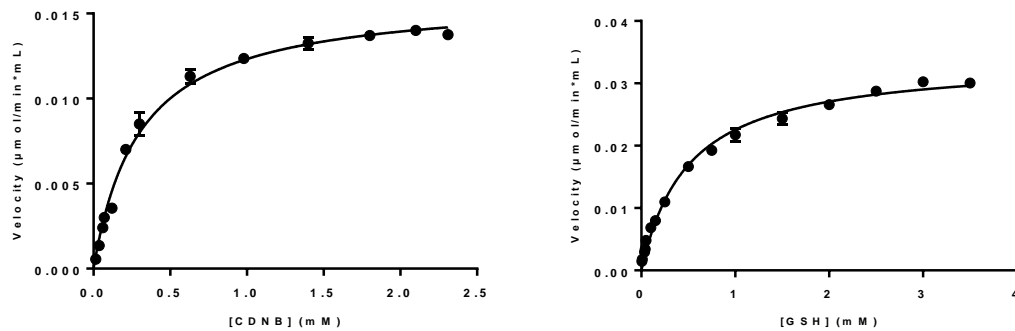
4.3.8 Κινητική ανάλυση τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* ως προς τα υποστρώματα CDNB, BDNB και NBD chloride

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το υπόστρωμα CDNB και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι K_m και k_{cat} (Πίνακας 4.11). Τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* ακολουθούν την εξίσωση κινητικής των *Michaelis Menten* και ως προς τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 4.9-4.10). Οι τιμές της K_m για το CDNB και τη GSH είναι μέσα στο εύρος τιμών των φυτικών GSTs (Labrou *et al.* 2004). Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της K_m έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB είναι η ίδια και για τα δύο ισοένζυμα ενώ έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH το *PvGSTU8.2* εμφανίζει περίπου διπλάσια τιμή σε σχέση με το άλλο ισοένζυμο. Η k_{cat} για το *PvGSTU8.1* φαίνεται να είναι περίπου 15-φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το *PvGSTU8.2* (Πίνακας 4.11).

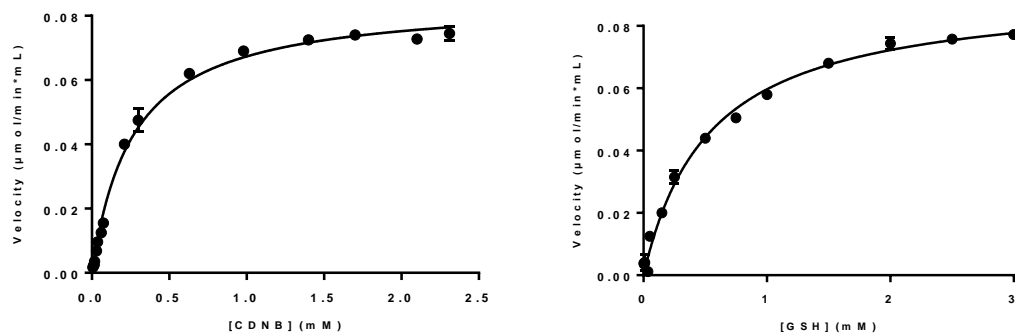
Σχετικά με το BDNB, που φαίνεται να είναι ένα από τα καλύτερα υποστρώματα και για τα δύο ισοένζυμα, παρατηρείται η ίδια εικόνα. Δηλαδή, όταν χρησιμοποιήθηκε το BDNB ως μεταβλητό υπόστρωμα με τη συγκέντρωση της GSH σταθερή και το αντίστροφο, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο ισοένζυμα υπακούουν στην εξίσωση των *Michaelis Menten* (Εικόνα 4.11-4.12). Η τιμή της K_m για το *PvGSTU8.1* εμφανίζεται να είναι 2,5-φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το *PvGSTU8.2*, έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το BDNB. Στην περίπτωση που το μεταβαλλόμενο

υπόστρωμα είναι η GSH, η τιμή της K_m για το PnGSTU8.1 εμφανίζεται να είναι 4,5-φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με το PnGSTU8.2. Όσο αναφορά στην τιμή της σταθεράς εξειδίκευσης, το PnGSTU8.2 φαίνεται να έχει διπλάσια τιμή σε σύγκριση με το άλλο ισοένζυμο (Πίνακας 4.12).

Όσο αναφορά στο NBD-chloride, το οποίο εμφανίζει σχετικά υψηλή ειδική δραστηριότητα, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για να υπολογιστούν οι βασικές κινητικές σταθερές. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2 υπακούουν στην εξίσωση των *Michaelis Menten* και για τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 4.13-4.14). Οι τιμές της K_m και για τα δύο ισοένζυμα είναι σχετικά χαμηλές αποδεικνύοντας την υψηλή συγγένεια με τα αντίστοιχα υποστρώματα. Η k_{cat} για το PnGSTU8.1 είναι αρκετά πιο μεγάλη σε σχέση με το PnGSTU8.2 (Πίνακας 4.13).



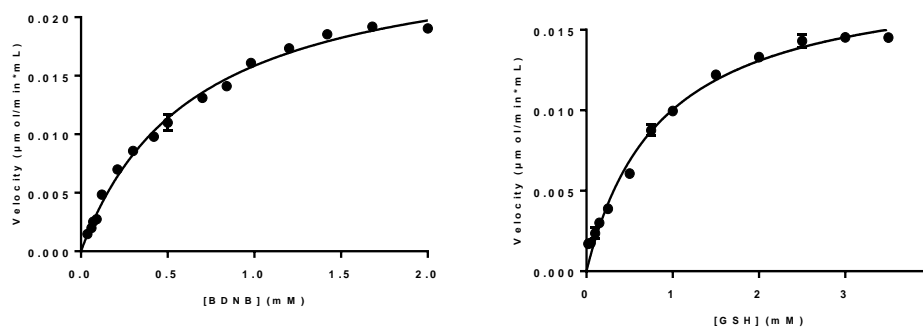
Εικόνα 4.9: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο PnGSTU8.1.



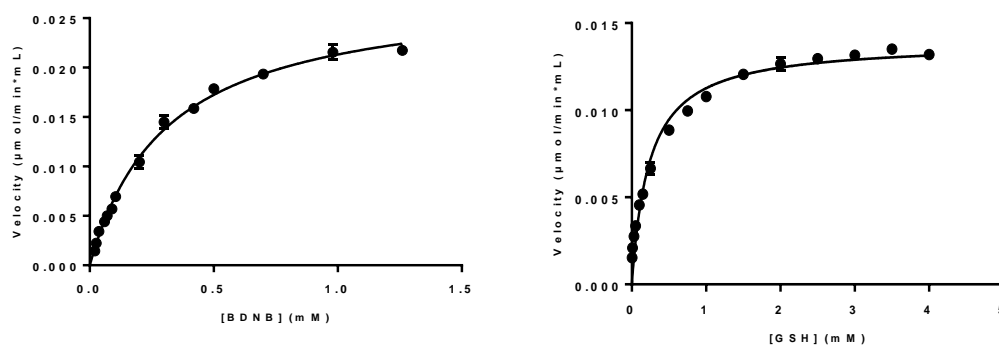
Εικόνα 4.10: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο PnGSTU8.2.

Πίνακας 4.11: Κινητικές σταθερές για τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 PnGSTU8.2 για το σύστημα CDNB/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	PnGSTU8.1		PnGSTU8.2	
	CDNB	GSH	CDNB	GSH
K_m (mM)	$0,3 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,2$
k_{cat} (min^{-1})	$453,0 \pm 13,6$		$30,7 \pm 4,2$	



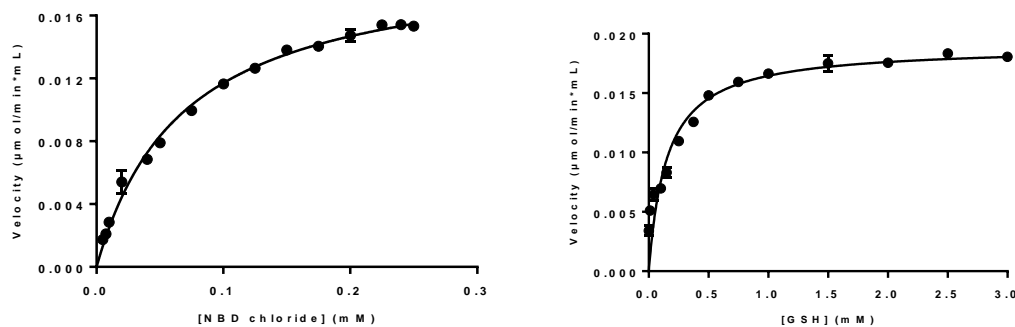
Εικόνα 4.11: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο PnGSTU8.1.



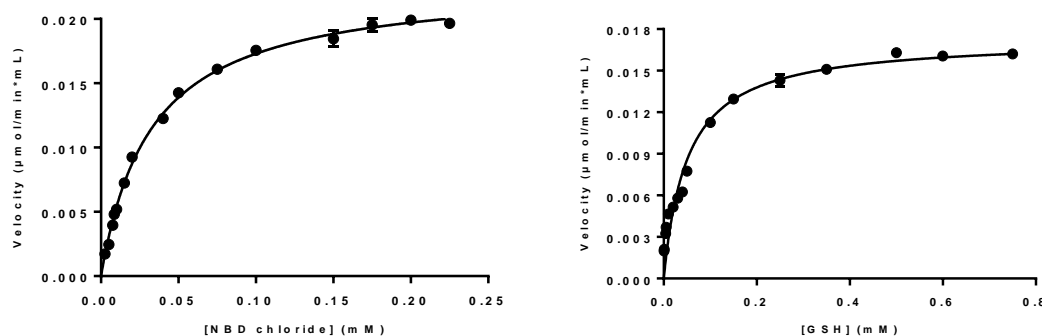
Εικόνα 4.12: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο PnGSTU8.2.

Πίνακας 4.12: Κινητικές σταθερές για τα ισοένζυμα PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2 για το σύστημα BDNB/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	PnGSTU8.1		PnGSTU8.2	
	BDNB	GSH	BDNB	GSH
K_m (mM)	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,02$
k_{cat} (min^{-1})	$390 \pm 6,3$		$720 \pm 5,2$	



Εικόνα 4.13: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο *PnGSTU8.1*.



Εικόνα 4.14: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*.

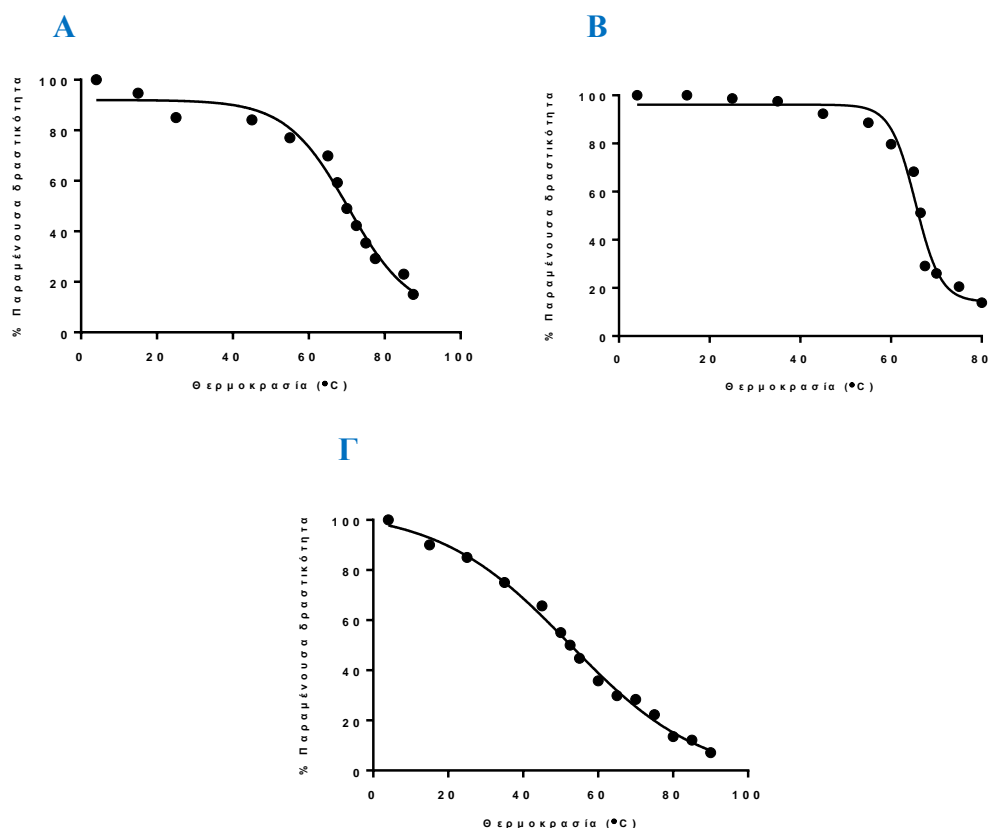
Πίνακας 4.13: Κινητικές σταθερές για τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* για το σύστημα NBD-chloride/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	<i>PnGSTU8.1</i>		<i>PnGSTU8.2</i>	
	NBD-chloride	GSH	NBD-chloride	GSH
K_m (mM)	$0,07 \pm 0,004$	$0,2 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,01$
k_{cat} (min^{-1})	$410 \pm 9,2$		$0,2 \pm 0,003$	

4.3.9 Θερμική σταθερότητα φυτικών ισοενζύμων

Μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των φυτικών ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* σε ένα εύρος θερμοκρασιών που κυμαινόταν από τους 4-90 °C. Το σημείο τήξεως (T_m) ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται στο μισό (50 %). Όπως παρατηρούμε και στον Πίνακα 4.14, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* παρουσιάζει σημείο τήξεως στους 71,8 °C, θερμοκρασία σχετικά υψηλή για τις GSTs. Από την άλλη μεριά, τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*, εμφανίζουν μικρότερο σημείο τήξεως. Πιο συγκεκριμένα, το *PnGSTU8.1*

παρουσιάζει σημείο τήξεως τους 66,4 °C και το *PvGSTU8.2* περίπου δέκα βαθμούς χαμηλότερο, στους 54,1 °C (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης των ισοενζύμων (A) *GmGSTU5-5*, (B) *PvGSTU8.1* και (Γ) *PvGSTU8.2*.

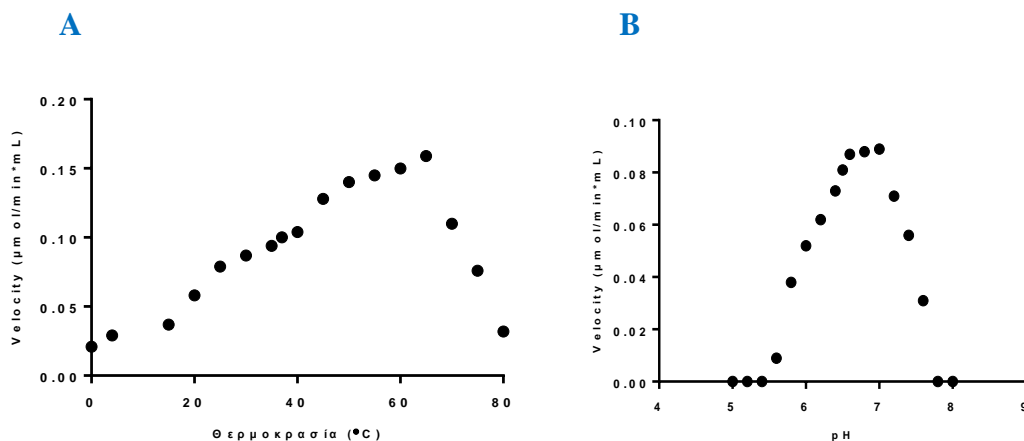
Πίνακας 4.14: Τιμές σημείου τήξεως φυτικών ισοενζύμων.

Ένζυμο	T _m (°C)
<i>GmGSTU5-5</i>	71,8 ± 1,1
<i>PvGSTU8.1</i>	66,4 ± 0,9
<i>PvGSTU8.2</i>	54,1 ± 1,0

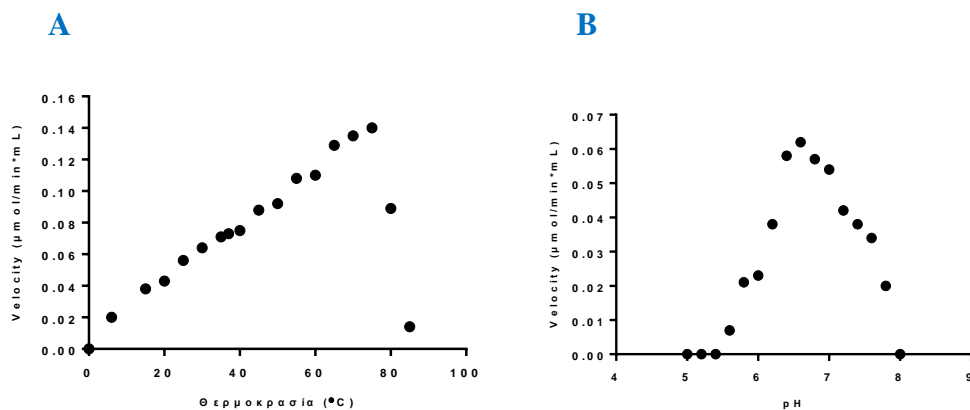
4.3.10 Επίδραση θερμοκρασίας και pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης έναντι της θερμοκρασίας εκτιμήθηκε σε θερμοκρασιακό εύρος το οποίο κυμανθήκαμε από 0 - 90 °C, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5 με το σύστημα GSH/CDNB. Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από το pH εκτιμήθηκε σε εύρος pH 5-5,8 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως 0,1 M - όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M ενώ σε εύρος pH 6-8 σε ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού δινατρίου 0,2 M - δισόξινου φωσφορικού νατρίου 0,2 M με το σύστημα GSH/CDNB.

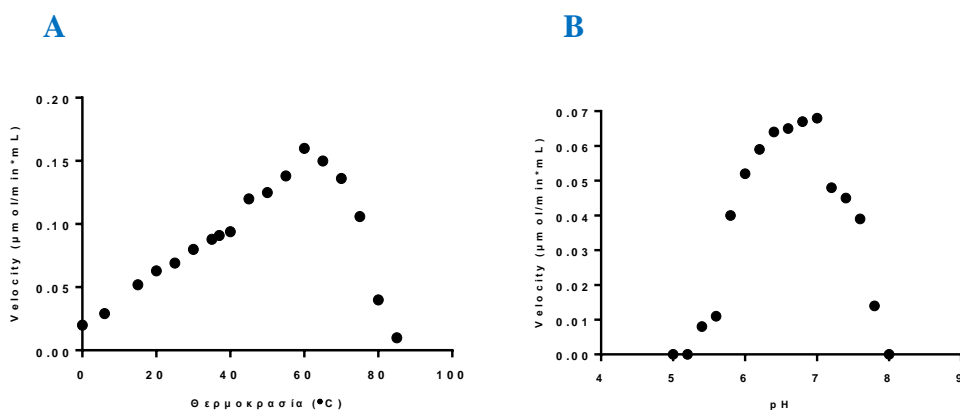
Αναλυτικότερα, το *GmGSTU5-5* φαίνεται να εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία στους 65 °C, το *PvGST8.1* στους 75 °C ενώ το *PvGST8.2* δεκαπέντε βαθμούς χαμηλότερη, στους 60 °C. Και τα τρία ισοένζυμα έχουν βέλτιστη θερμοκρασία πέραν των αναμενόμενων ορίων για τις GSTs (Wan *et al.*, 2016). Όσον αφορά στο pH το *GmGSTU5-5* και το *PvGST8.2* εμφανίζει βέλτιστο pH στο 7 ενώ το *PvGST8.1* στο 6,6 (Εικόνα 4.16–4.18).



Εικόνα 4.16: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* σε συνάρτηση με τη (Α) θερμοκρασία και το (Β) pH.



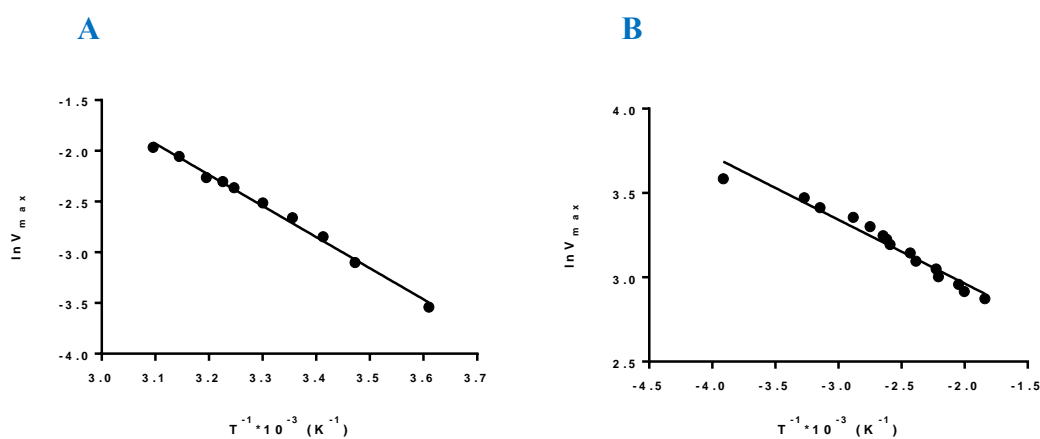
Εικόνα 4.17: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης για το ισοένζυμο *PvGSTU8.1* σε συνάρτηση με τη (Α) θερμοκρασία και το (Β) pH.

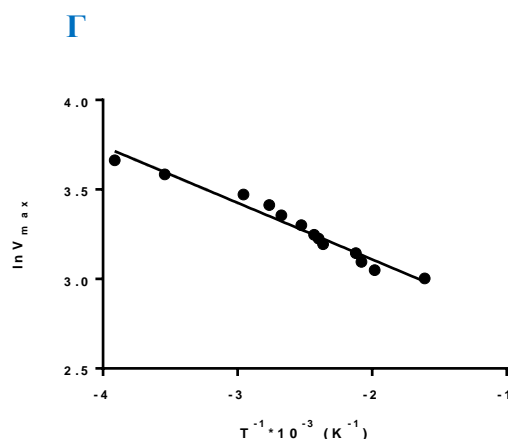


Εικόνα 4.18: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2* σε συνάρτηση με τη (A) θερμοκρασία και το (B) pH.

4.3.11 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης των GST ισοενζύμων

Για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (V_{\max}) των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την § 4.3.10 και προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Arrhenius (Εικόνα 4.19). Αφού υπολογίστηκαν οι τιμές της V_{\max} κατασκευάστηκε το διάγραμμα του $\ln V_{\max}$ σε συνάρτηση με το αντίστροφο της θερμοκρασίας. Η κλίση της ευθείας που προκύπτει ισούται με $-E_a/R$, σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius. Έτσι, υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης (Πίνακας 4.15).





Εικόνα 4.19: Τα δεδομένα της μέγιστης ταχύτητας προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Arrhenius για τα ισοένζυμα (A) *GmGSTU5-5*, (B) *PnGSTU8.1*, (Γ) *PnGSTU8.2*.

Σύμφωνα με τον Πίνακα παρακάτω βλέπουμε ότι κάθε ισοένζυμο φαίνεται να έχει διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης (Πίνακας 4.15). Μικρότερες E_a υποδηλώνουν ότι η αντίδραση πραγματοποιείται ευκολότερα. Από τα φυτικά ισοένζυμα, το *PnGSTU8.2* φαίνεται να έχει τη μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Ακολουθεί το *PnGSTU8.1* και τέλος το *GmGSTU5-5*.

Πίνακας 4.15: Ενέργεια ενεργοποίησης φυτικών ισοενζύμων.

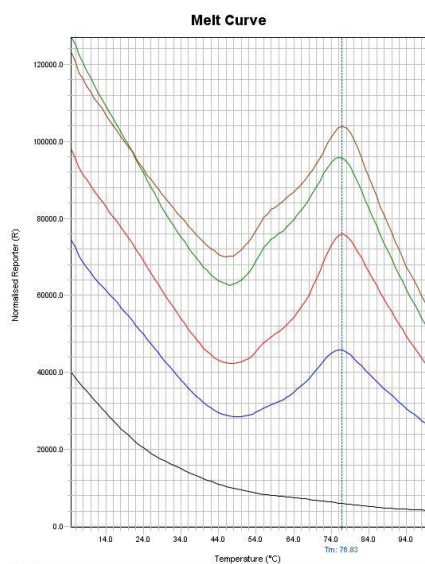
Ένζυμο	Ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) ($Jmol^{-1}K^{-1}$)
<i>GmGSTU5-5</i>	25,5
<i>PnGSTU8.1</i>	12,28
<i>PnGSTU8.2</i>	8,539

4.3.12 Θερμική διαδικασία μετατόπισης για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5*

Με τη θερμική δοκιμασία μετατόπισης μπορούμε να παρακολουθήσουμε τη θερμική καθώς και τη δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών. Μελετάται η μετάβαση από τη μια κατάσταση στην άλλη κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Το σημείο καμψής της καμπύλης μετάβασης ορίζεται ως το σημείο τήξεως της πρωτεΐνης (T_m) δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται στο μισό (50 %).

Αρχικά, μελετήθηκε εάν η διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης (μg) επηρεάζει το σημείο τήξεως αυτής. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών μαζί με κατάλληλη χρωστική. Η μέτρηση διεξήχθη σε εύρος θερμοκρασιών 4 °C - 99 °C.

Η διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στην καμπύλη θερμικής μετατόπισης του ισοενζύμου *GmGSTU5-5* (Εικόνα 4.20). Η καμπύλη μετουσίωσης εμφανίζει μία μόνο κορυφή, με μέγιστη ένταση φθορισμού στους 75,6 °C για το ισοένζυμο *GmGSTU5-5*. Η μείωση του φθορισμού στη δεξιά πλευρά της κορυφής οφείλεται στη μετουσιωμένη μορφή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 4.20: Εξίσωση Boltzmann σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης για το *GmGSTU5-5*. Control (0 µg), 0,9 µg, 1,62 µg, 2,63 µg, 3,5 µg.

4.3.13 Σάρωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων ως δυνητικών αναστολέων ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ως δυνητικοί αναστολείς των GST ισοενζύμων, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία και απουσία αυτών (100 µM). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.37.

Στον παρακάτω Πίνακα 4.16 εμφανίζεται η % παραμένουσα δραστηριότητα την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*, έναντι των φυτοπροστατευτικών ως δυνητικών αναστολέων.

Πίνακας 4.16: Παραμένουσα δραστηριότητα (%) που παρουσιάζουν τα ισοένζυμα *PvGSTU8.2* και *PvGSTU8.1* έναντι των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ως 100 % ορίζεται η μέτρηση απουσία αναστολέα.

Κατηγορία φυτοπροστατευτικού προϊόντος	Όνομασία	Παραμένουσα Δραστικότητα (%) <i>PvGSTU8.2</i>	Παραμένουσα Δραστικότητα (%) <i>PvGSTU8.1</i>	
Ζιζανιοκτόνα	Χλωροακε-ταμίδια	Alachlor	49,0	53,4
		Metolachlor	74,5	77,2
	Τριαζίνες	Atrazine	65,7	50,0
		Terbuthilazine	81,3	75,0
		Diuron	68,6	69,3
	Διφαινυλικοί αιθέρες	Fluorodifen	75,3	82,0
		Desmedipham	73,5	62,5
		Phenmedipham	72,5	38,2
	Οργανογλω- ριωμένα	Endosulfan (20mM)	22,5	33,0
		α-endosulfan	0	5,7
		β-endosulfan	0	0
	Καρβαμιδικά	Carbaryl	64,7	60,2
		Methomyl	78,2	82,0
		Pirimicarb	83,3	77,3
Οργανοφωσφορικά	Malathion	74,5	75,4	
Πυρεθροειδή	Fenvalerate	7,2	36,3	
	Permethrin	62,3	75	
	lambda- cyhalothrin	64,5	61,9	
	Spiromesifen	54,6	56,0	
Εντομοκτόνα	Εστέρες τετρονικού οξέος	Spiroteramat	57,8	85,2
		Clothianidin	59,8	88,6
	Νεοκοτινοειδή	Imidacloprid	99,0	72,7
		Thiachloprid	102,0	98,0

	Φαινυλακου-λουρίες	Diflubenzuron	2,1	0
		Triflumuron	17,6	0
		Boscalid	79,4	57,9
	Ανιλίδια	Metalaxyl	67,6	40,4
		Fenhexamid	49,0	39,8
	Στρομπιλου-ρίνες	Fluoxastrobin	0	0
		Kresoxim-methyl	39,2	40,3
		Picoxystrobin	0	1,7
		Pyraclostrobin	0	0
		Trifloxystrobin	5,8	23,8
Fenamidone		60,1	85,2	
Δικαρβοξιμίδια	Iprodione	69,6	88,6	
	Vinclozolin	26,4	40,9	
Τριαζόλια	Epoxiconazole	61,7	62,7	
	Prothioconazole	37,2	31,8	
	Triadimenol	84,3	78,4	
Αμίδιο	Mandipropamid	62,1	63,6	
Μυκητοκτόνα	Ανιλικο-πυριμιδίνη	Pyrimethanil	50,0	92,0
	Βενζαμίδιο	Zodiuim zoxide	72,0	69,0
		Fluopyram	68,6	69,3
	Βενζιμιδαζόλιο	Carbedazim	105,0	78,7
	Φαινυλοπυρ-ρολικό	Fludioxonil	0	27,6
	Οργανοφω-σφορικοί εστέρες	Tolclofosmethyl	12,7	38,6

Από τα αποτελέσματα της σάρωσης προέκυψε ότι και τα δύο ισοένζυμα παρουσιάζουν ευρεία εκλεκτικότητα στη δέσμευση φυτοπροστατευτικών. Τα φυτοπροστατευτικά έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες με βάση το ποσοστό της αναστολής που παρουσιάζουν :

Ομάδα ενώσεων υψηλής αναστολής

Για το PvGSTU8.1

Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά endosulfan, α-endosulfan, β-endosulfan, fenvalerate, thiachloprid, fluoxastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, fludioxonil και tolclofosmethyl οι οποίες παρουσιάζουν κατά προσέγγιση ολική αναστολή του ισοενζύμου.

Για το PvGSTU8.2

Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά α-endosulfan β-endosulfan, diflubenzuron, triflumuron, fluoxastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin και fludioxonil οι οποίες παρουσιάζουν κατά προσέγγιση ολική αναστολή του ισοενζύμου.

Ομάδα ενώσεων μέτριας αναστολής

Για το PvGSTU8.1

Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά alachlor, atrazine, phenmedipham, endosulfan, α-endosulfan, β-endosulfan, carbaryl, fenvalerate, permethrin, lambda- cyhalothrin, Spiromesifen, spirotamat, clothianidin, diflubenzuron, triflumuron, fenhexamid, Fluoxastrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, fenamidone, vinclozolin, epoxiconazole, prothioconazole, mandipropamid, pyrimethanil, fludioxonil και tolclofosmethyl τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου περίπου από 31 έως 65 %.

Για το PvGSTU8.2

Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά alachlor, atrazine, desmedipham, phenmedipham, endosulfan, α-endosulfan, β-endosulfan, carbaryl, fenvalerate, lambda- cyhalothrin, Spiromesifen, diflubenzuron, triflumuron, boscalid, metalaxyl, fenhexamid, fluoxastrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, vinclozolin, epoxiconazole, prothioconazole, mandipropamid, fludioxonil και tolclofosmethyl τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου περίπου από 31 έως 65 %.

Ομάδα ενώσεων χαμηλής αναστολής

Για το *PvGSTU8.1*

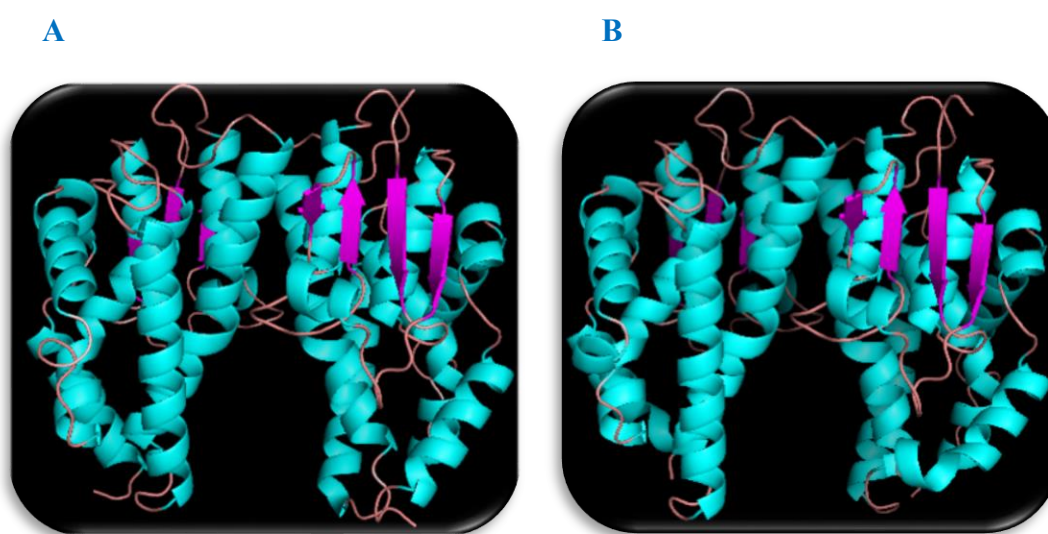
Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά metolachlor, terbuthylazine, diuron, fluorodifen, desmedipham, phenmedipham, methomyl, malathion, imidacloprid, thiachloprid, boscalid, metalaxyl, iprodione, triadimenol, fluopyram και carbedazim τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου πάνω 66 %.

Για το *PvGSTU8.2*

Περιλαμβάνει τα φυτοπροστατευτικά metolachlor, terbuthylazine, diuron, fluorodifen, methomyl, pirimicarb, malathion, permethrin, Spiromesifen, spirotoramant, clothianidin, imidacloprid, thiachloprid, fenamidone, iprodione, triadimenol, pyrimethanil, fluopyram και carbedazim τα οποία παρουσιάζουν κατά προσέγγιση αναστολή του ισοενζύμου πάνω 66 %.

4.3.14 Βιοϋπολογιστική μελέτη και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας των *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*

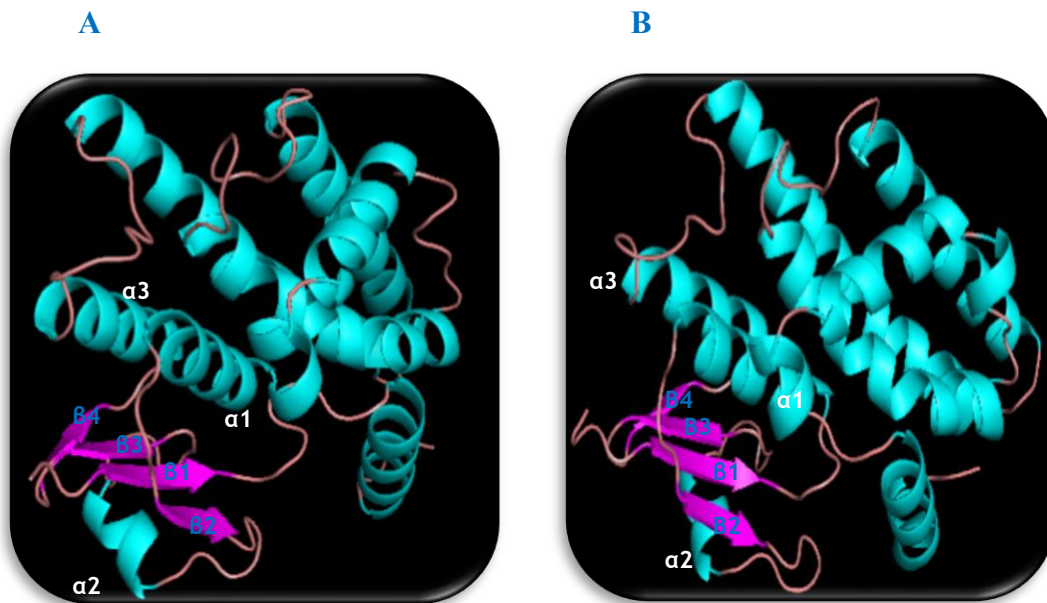
Για να κατανοηθούν καλύτερα οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες των ενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*, προσδιορίστηκε η δομή τους με ομόλογη μοντελοποίηση. Η τρισδιάστατη δομή τους βασίστηκε σε δομές φυτικών GSTs, που προσδιορίστηκαν κρυσταλλογραφικά μέσω ακτίνων X (Πίνακας 4.17). Τα δύο ένζυμα μοιράζονται σχεδόν το ίδιο πρότυπο δομής Εικόνα 4.21.



Εικόνα 4.21: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής των ενζύμων, *PvGSTU8.1* (A) και *PvGSTU8.2* (B). Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Τα διμερή αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Και για τα δύο ισοένζυμα οι υπομονάδες είναι σχεδόν όμοιες και σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 4.22). Ένα εμφανές χαρακτηριστικό του διμερούς είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό του μορίου, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η μεγάλη οπή που επιτρέπει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στα ενεργά κέντρα του ενζύμου.

Κάθε μονομερές των *PvGSTUs* αποτελείται από δύο δομικές περιοχές. Τη N-τελική περιοχή με μοτίβο α/β ($\beta\alpha\beta\beta\alpha$) (κατάλοιπα 15-88 για το ισοένζυμο *PvGSTU8.1* και 7-80 για το ισοένζυμο *PvGSTU8.2*) και τη C-τελική περιοχή με μοτίβο τύπου α (κατάλοιπα 99-223 για το ισοένζυμο *PvGSTU8.1* και 91-215 για το ισοένζυμο *PvGSTU8.2*).



Εικόνα 4.22: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς των *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\alpha 1$, $\alpha 2$, και $\alpha 3$ χαρακτηρίζονται οι α -έλικες και ως $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$ χαρακτηρίζονται τα β -ελάσματα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Και για τα δύο ισοένζυμα η N-τελική δομική περιοχή τους αποτελείται από τρεις α -έλικες. Μία μεγάλου μήκους $\alpha 1$ αποτελούμενη από 13 κατάλοιπα, μία μεσαίου $\alpha 3$ αποτελούμενη από 11 κατάλοιπα και μία μικρού $\alpha 2$ αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα (Εικόνα 4.22). Στις α -έλικες, όλες οι ομάδες NH και C=O συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου εκτός από τις πρώτες ομάδες NH και τις τελευταίες ομάδες C=O στα άκρα

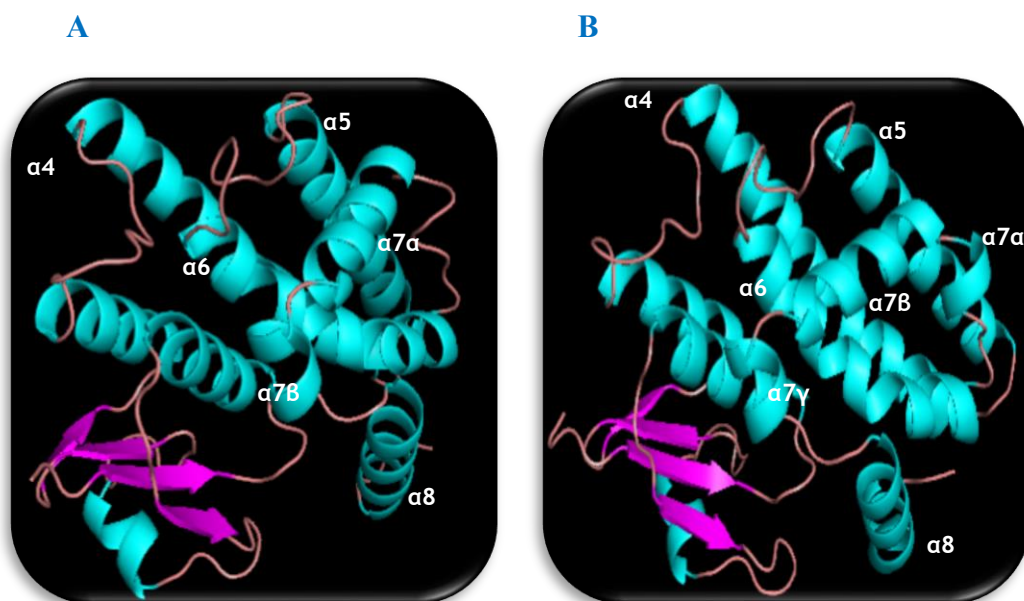
της έλικας. Συνεπώς, τα άκρα των α-ελίκων είναι πολικά και γι' αυτό βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου.

Επίσης, η N-τελική δομική τους περιοχή αποτελείται από β-φύλλα δηλαδή από τέσσερα β-ελάσματα και επιδεικνύουν μία δεξιόστροφη κάμψη. Τρία μεσαίου μήκους, τα β1, β2 και β3 και ένα μικρότερου β4. Το έλασμα β3 παρατάσσεται αντιπαράλληλα στα άλλα τρία (β1, β2 και β4). Από τη μία πλευρά, τα β-φύλλα περιβάλλονται από τις δύο α-έλικες α3 και α2, από τις οποίες η α2 είναι τοποθετημένη στην περιοχή που είναι εκτεθειμένη προς το διαλύτη (Εικόνα 4.22). Τα β-ελάσματα στοιχίζονται γειτονικά το ένα με το άλλον με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις C=O ομάδες του ενός ελάσματος με τις NH ομάδες του άλλου ελάσματος και αντίστροφα. Τα β-ελάσματα συνδυάζονται σε μεικτή β-πτυχωτή επιφάνεια, με το ένα ζεύγος β-ελασμάτων (β1-β2) να είναι παράλληλο και δύο αντιπαράλληλα (β1-β3 και β3-β4). Στον παράλληλο συνδυασμό (β1-β2) όλα τα αμινοξέα των β-ελασμάτων έχουν την ίδια βιοχημική κατεύθυνση, από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο ενώ στην αντιπαράλληλη σύνδεση (β1-β3 και β3-β4) έχουν αντίθετες κατευθύνσεις, δηλαδή το ένα έλασμα κατευθύνεται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο και ο επόμενος από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό (Εικόνα 4.22).

Οι α-έλικες καθώς κι οι β-πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων. Βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυνητικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενα β-ελάσματα ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και το μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β-φουρκέτας. Το β1-έλασμα συνδέεται με την α-έλικα α1 καθώς και η α-έλικα α1 με τον β2-έλασμα με ένα μικρό βρόγχο μήκους τεσσάρων καταλοίπων ο καθένας. Το β2-έλασμα συνδέεται με την επόμενη α-έλικα (α2) με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο επτά καταλοίπων. Η α2 α-έλικα με τον β3 με ένα βρόγχο οκτώ καταλοίπων. Η σύνδεση των κλώνων β3 και β4 εμφανίζεται με το μοτίβο β-φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, το έλασμα β4 ενώνεται με την α-έλικα α3 μόνο με 2 κατάλοιπα (Εικόνα 4.23).

Η C-τελική δομική ενότητα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή και αποτελείται από τα κατάλοιπα 99 έως 223 για το ισοένζυμο PnGSTU8.1 καθώς και από τα κατάλοιπα 91 έως 215 για το ισοένζυμο PnGSTU8.2 για όλες τις

υπομονάδες. Αποτελείται από μοτίβο α-έλικας, με οκτώ α-έλικες διευθετημένες σε αριστερόστροφη περιέλιξη (Εικόνα 4.23).

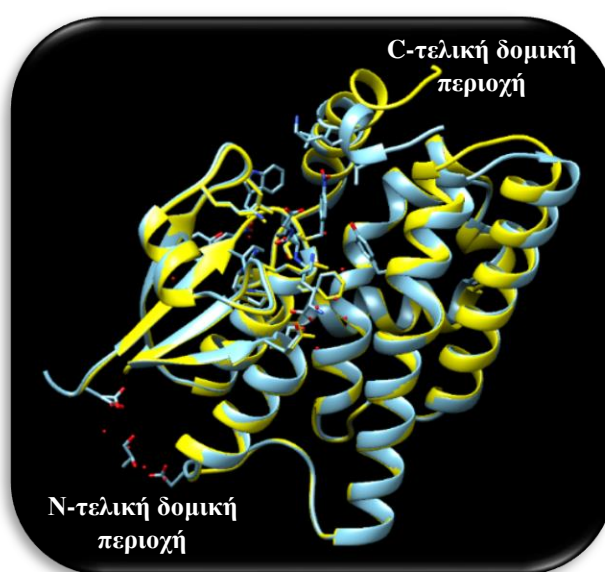


Εικόνα 4.23: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς των *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως α4, α5, α6, α7α, α7β, α7γ και α8 χαρακτηρίζονται οι α-έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της C-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Η α-έλικα α4, αποτελούμενη από 26 κατάλοιπα για το ισοένζυμο *PnGSTU8.1* και 27 για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*, είναι ευθεία και προσανατολισμένη σχεδόν παράλληλα στην α-έλικα α6 (20 κατάλοιπα και για τα δύο ισοένζυμα). Η α-έλικα α7 παρουσιάζει μια απότομη στρέψη στο αριστερό της άκρο και γι' αυτό και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως δύο έλικες, με τις ονομασίες α7α (αποτελούμενη από 12 κατάλοιπα) και α7β (αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα) για το ισοένζυμο *PnGSTU8.1*. Όσο αφορά στο ισοένζυμο *PnGSTU8.2* η α-έλικα α7 παρουσιάζει απότομες στρέψεις και στα δύο άκρα της γι' αυτό και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως τρεις έλικες, με τις ονομασίες α7α (αποτελούμενη από 4 κατάλοιπα), α7β (αποτελούμενη από 12 κατάλοιπα) και α7γ (αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα). Η α7β, αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα για το ισοένζυμο *PnGSTU8.1* και 12 για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2* εμφανίζει κατά κάποιο τρόπο κάθετη διεύθετηση με τις α4, α5 (21 κατάλοιπα και για τα δύο ισοένζυμα) και α6 (Εικόνα 4.23). Η α-έλικα α6 συνδέεται με την έλικα α7α μέσω ενός βρόγχου μεσαίου μήκους, οκτώ καταλοίπων, για το ισοένζυμο *PnGSTU8.1* ενώ για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2* ο ίδιος βρόγχος αποτελείται από μόλις τρία κατάλοιπα. Τέλος,

η α -έλικα $\alpha 8$ αποτελείται σχεδόν από τα ίδια κατάλοιπα, δεκατέσσερα για το ισοένζυμο *PvGSTU8.1* και δεκαπέντε για το ισοένζυμο *PvGSTU8.2*.

Στην παρακάτω εικόνα παρατηρούμε την εκπληκτική ομοιότητα που παρουσιάζουν τα δύο ισοένζυμα (Εικόνα 4.24 - 4.25). Οι ελάχιστες διαφορές εστιάζονται στην αρχή της C-τελικής δομικής περιοχής καθώς και στο βρόγχο ανάμεσα στην $\alpha 4$ και $\alpha 5$ α -έλικα (Πίνακας 4.18). Ο βρόγχος πριν το $\beta 1$ -έλασμα του ισοενζύμου *PvGSTU8.1* είναι αρκετά μεγαλύτερος και προσδίδει μεγαλύτερη κινητικότητα στο συγκεκριμένο ισοένζυμο.

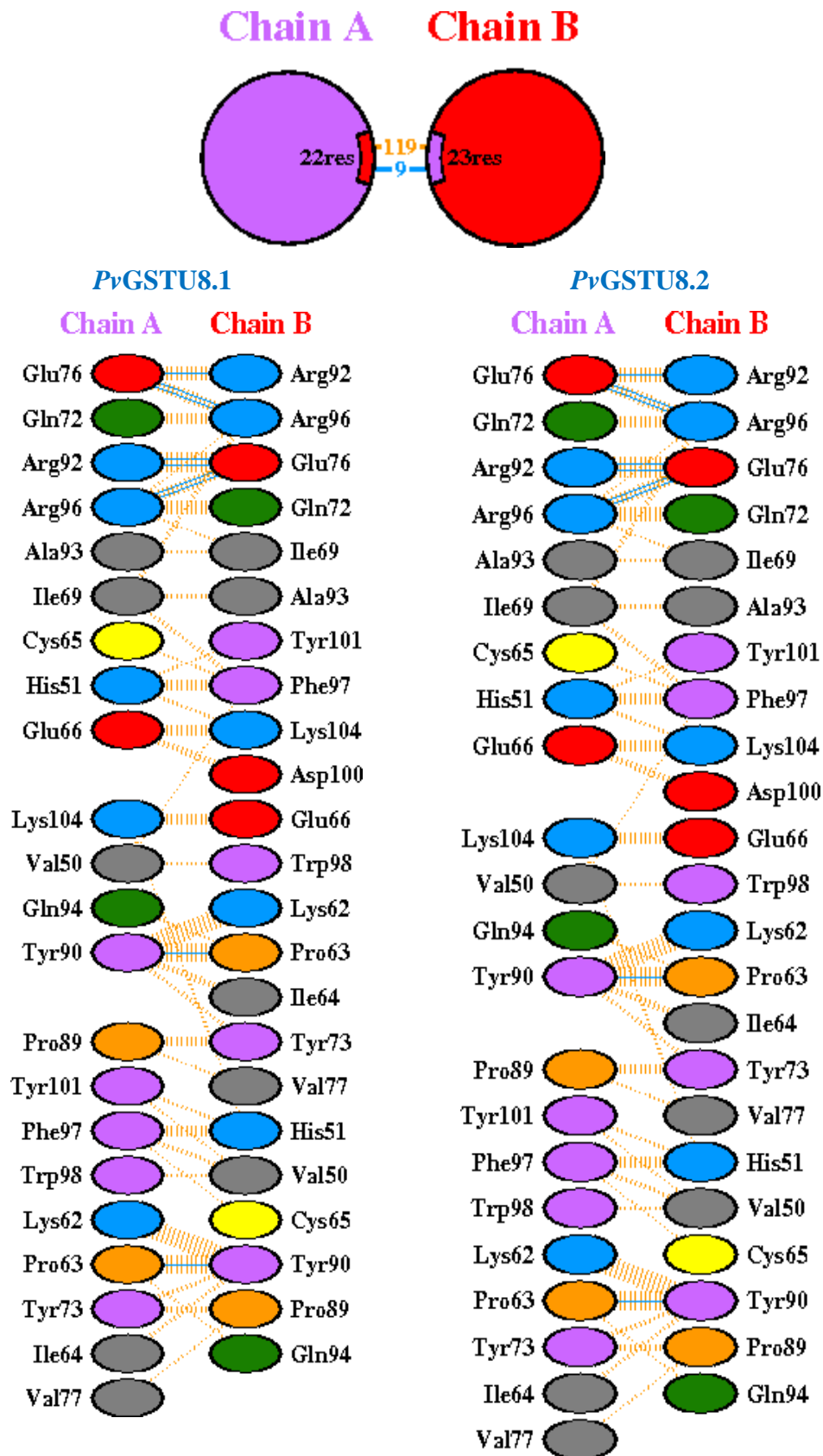


Εικόνα 4.24: Δομική ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών μοντέλων των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* (κίτρινο) και *PvGSTU8.2* (γαλάζιο). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

Πίνακας 4.17: Κρυσταλλικές δομές GSTs που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ομόλογη μοντελοποίηση.

Ένζυμο	Κωδικός αρχείου pdb	Είδος φυτού	Τάξη	Ομοιότητα (%)
<i>PvGSTU8.1</i>	4top.1.A	<i>Glycine max</i>	<i>tau</i>	86,2
<i>PvGSTU8.2</i>	2vo4.1.A	<i>Glycine max</i>	<i>tau</i>	85,8

Εικόνα 3.25: Σχηματικό διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων επιφανείας μεταξύ των αλυσίδων της πρωτεΐνης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WhatIf.



Υπόμνημα: Η μπλε γραμμή φανερώνει δεσμό υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων, η διακεκομμένη πορτοκαλί φανερώνει άλλες αλληλεπιδράσεις (το πάχος των διακεκομμένων γραμμών δείχνει την ένταση των αλληλεπιδράσεων αυτών).

Πίνακας 4.18: Στατιστικά επιφανείας αλληλεπίδρασης για το ισοένζυμο PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2.

PnGSTU8.2 PnGSTU8.1

Αλυσίδες	Κατάλοιπα επιφανείας	Περιοχή επιφανείας (Å ²)	Αριθμός δεσμών υδρογόνου	Αριθμός άλλων αλληλεπιδράσεων
A	22	1125	9	119
B	23	1122		
A	22	1125	9	119
B	23	1122		

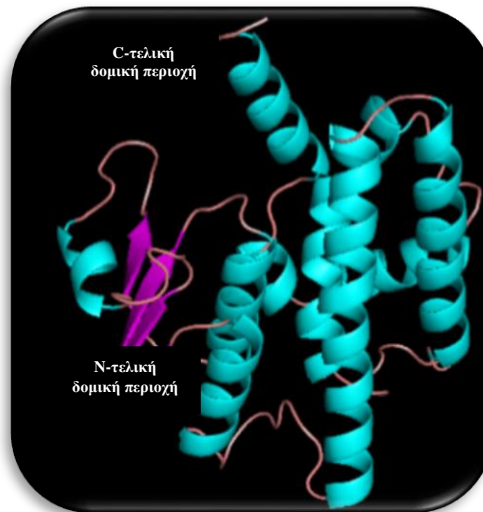
4.3.15 Βιοϋπολογιστική και ανάλυση δομής του ισοενζύμου GmGSTU5-5

Για να κατανοηθούν οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του ισοενζύμου GmGSTU5-5 προβλέφθηκε η δομή του με τη βοήθεια του προγράμματος PYMOL. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.26 το ένζυμο αποτελείται από τη συντηρημένη N-τελική δομική περιοχή που μοιάζει με τη θειορεδοξίνη, με δομή α/β και τη μεγαλύτερη C-τελική δομική περιοχή που περιλαμβάνει α-έλικες. Ένας σύντομος βρόγχος συνδέει τη N- και C-τελική περιοχή και βρίσκεται στο άκρο της α-έλικας α3. Η C-τελική δομική περιοχή αποτελείται από τέσσερις α-έλικες, τις α4, α5, α6 και α7 ενώ η G-θέση αποτελείται από τις α-έλικες α1, α2 και α3.

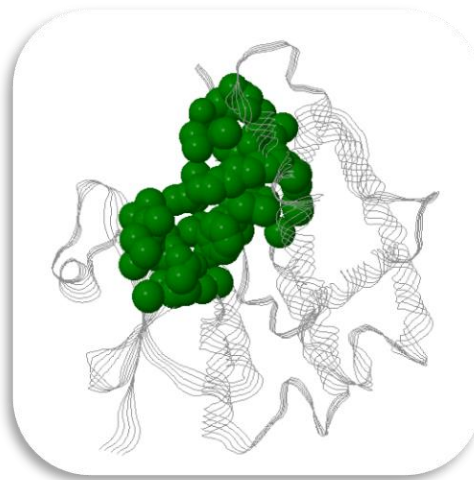
Η προσβασιμότητα του υποστρώματος και η ανάλυση της υδροπάθειας του ενζύμου GmGSTU5-5 δείχνουν ότι η θέση αλληλεπίδρασης είναι θαμμένη στο εσωτερικό του ενεργού κέντρου και αποτελείται κυρίως από υπολείμματα υδρόφοβων αμινοξέων (Εικόνα 4.26).

Το μοντέλο με τη μεγαλύτερη ομολογία αναλύθηκε με CASTp για να βρεθούν οι κοιλότητες που σχηματίζονται από τη δομή του ισοενζύμου. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία μιας μεγάλης κοιλότητας σε κάθε υπομονάδα με εμβαδόν 650 Å² και όγκο 834,9 Å³ που επικαλύπτει την G- και H-θέση (Εικόνα 4.27). Το μέγεθος αυτής δείχνει ότι είναι αρκετά μεγάλο για να φιλοξενήσει μεγάλου μοριακού μεγέθους υποστρώματα και αναστολείς, γεγονός που εξηγεί την ευρεία

εκλεκτικότητα που εμφανίζει το συγκεκριμένο ισοένζυμο. Η δεύτερη κοιλότητα που υπάρχει είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και καταλαμβάνει σημαντικά μικρότερο μέγεθος σε σχέση με την προηγούμενη, εμβαδόν $414,9 \text{ \AA}^2$ και όγκο $698,1 \text{ \AA}^3$.



Εικόνα 4.26: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του *GmGSTU5-5* (PDB code: 5g5e). Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Επισημαίνονται οι N- και η C-τελική δομική περιοχή. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (DeLano, 2002).



Εικόνα 4.27: Ανάλυση CASTp για την αναγνώριση της κύριας μεγάλης κοιλότητας (υποθετικές θέσεις L) στο ισοένζυμο *GmGSTU5-5*. Τα αμινοξέα που συμβάλλουν στο σχηματισμό των κύριων κοιλότητων είναι χρωματισμένα με πράσινο χρώμα.

4.4 Συζήτηση

cDNA από GST της *tau* τάξης από *Glycine max* ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, pETite C-His vector. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός GST ισοενζύμων από *Phaseolus vulgaris* σε βακτήρια *E. coli* του στελέχους HI Control BL21(DE3). Ακολούθησε έκφραση και καθαρισμός των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*. Τα τρία ισοένζυμα καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 115 %, 106 % και 93,5 %, αντίστοιχα.

Ακολούθησε μελέτη των τριών ισοενζύμων ως προς ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν και άλλες δράσεις τους όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή θειολοτρανσφεράσης. Αναλυτικότερα, τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* φαίνεται να καταλύουν μια πληθώρα υποστρωμάτων, δηλαδή δεκαπέντε από τα δεκαοκτώ σε αντίθεση με το *GmGSTU5-5* όπου φαίνεται να εμφανίζει περιορισμένη εκλεκτικότητα, καθώς καταλύει εννιά υποστρώματα σε σύνολο δεκαοκτώ. Η *tau* τάξη των φυτικών GSTs παρουσιάζει μια ευρεία εξειδίκευση όσον αφορά στα υποστρώματα που καταλύει και αυτό ίσως σχετίζεται με το ρόλο που επιτελεί στο αβιοτικό στρες (Cummins *et al.*, 2011; Govindarajan *et al.*, 2015).

Όσο αναφορά στο *GmGSTU5-5*, αποτέλεσαν αποδεκτά σχεδόν όλα υποστρώματα που είναι παράγωγα του νιτροβενζολίου, εκτός από το pNBC. Πιο συγκεκριμένα, το *GmGSTU5-5* παρουσίασε τη μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα με το FDNB, περίπου 2,5-φορές μεγαλύτερη από το CDNB που αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα για τις GSTs (Kobayashi *et al.*, 2001). Αξιοσημείωτη ειδική δραστικότητα εμφανίζει το *GmGSTU5-5* έναντι του BDNB. Το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εξετάστηκε, επίσης, για το εάν εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης. Είναι γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας οξειδωτικής καταπόνησης, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξείδια, μετατρέποντας τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Labrou *et al.*, 2015). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης καταλύοντας το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου και το τ-βουτυλο-υδροϋπεροξείδιο. Η αντιοξειδωτική δράση των GSTs συμβάλλει σημαντικά στην αντοχή στο στρες παρεμποδίζοντας τη συσσώρευση κυτταροτοξικών υδροϋπεροξειδίων και παραγώγων κυτταροτοξικής αλδεΐδης που

σχηματίζονται είτε άμεσα είτε έμμεσα ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες (Dixon *et al.*, 2002; Labrou *et al.*, 2015; Pouliou *et al.*, 2017; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το *GmGSTU5-5* φαίνεται να καταλύει την αντίδραση προσθήκης τηςθειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα). Πιο συγκεκριμένα ο ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας εμφανίζει την ίδια περίπου ειδική δραστικότητα με το CDNB ενώ ο ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας δεν αποτελεί υπόστρωμα για το *GmGSTU5-5*.

Τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* φαίνεται να καταλύουν σχεδόν όλα τα υποστρώματα, που είναι παράγωγα του νιτροβενζολίου, εκτός από το FDNB για το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*. Πιο συγκεκριμένα, για το *PnGSTU8.1* καλύτερο υπόστρωμα φαίνεται να είναι το BDNB (εμφανίζει 2,5-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με το ισοένζυμο *PnGSTU8.2*) ενώ για το *PnGSTU8.2* το pNBC (εμφανίζει 32,5-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με το *PnGSTU8.1*). Επίσης, εξετάστηκαν για το εάν εμφανίζουν δράση υπεροξειδάσης όμως τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν εμφανίζουν κάποια αξιόλογη ενζυμική δραστικότητα. Επιπλέον, το *PnGSTU8.2* εμφανίζει σχεδόν διπλάσια ειδική δραστικότητα με τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα σε σχέση με το *PnGSTU8.1*. Το *PnGSTU8.2* φαίνεται να παρουσιάζει 1450-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα έναντι του ισοθειοκυανικού αλλυλεστέρα σε σχέση με το *PnGSTU8.1*. Το *PnGSTU8.1* εμφανίζει σχετικά υψηλή ειδική δραστικότητα με το 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο ενώ σχεδόν μηδενική έχοντας ως υπόστρωμα το αιθακρινικό οξύ. Τα ισοένζυμα *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2* εμφανίζουν καταλυτική δράση έναντι της 2,2 διθειοδιαιθανόλης, με το *PnGSTU8.1* να παρουσιάζει 45-φορές μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με το *PnGSTU8.2*. Τέλος, το *PnGSTU8.2* εμφανίζει υψηλή ειδική δραστικότητα με το fluorodifen και το αιθακρινικό οξύ σε σχέση με το *PnGSTU8.2* που εμφανίζει σχεδόν μηδενική.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων με τα υποστρώματα που εμφάνισαν αξιόλογη ειδική δραστικότητα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυτικές GSTUs μελετήθηκαν κινητικά για το σύστημα GSH/CDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές. Όσον αφορά στο CDNB τα ισοένζυμα εμφανίζουν σχετικά παρόμοια K_m , περίπου 0,3 mM. Τιμή η οποία συγκαταλέγεται μέσα στο εύρος των K_m

που παρουσιάζουν οι GSTs (Perperopoulou *et al.*, 2016; Rouliou *et al.*, 2017). Όσον αναφορά στη GSH, ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, η K_m για το *GmGSTU5-5* φαίνεται να είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μεγάλη συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Για τα ισοένζυμα που προέρχονται από το *Phaseolus vulgaris* οι K_m παρουσιάζονται αρκετά μεγαλύτερες, πέντε και επτά φορές, αντίστοιχα.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το σύστημα GSH/BDNB όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές για τα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*. Πιο συγκεκριμένα, με μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το BDNB το *PvGSTU8.2* εμφανίζει περίπου δυο φορές πιο μικρή K_m σε σχέση με το *PvGSTU8.1*. Έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH, και σε αυτή την περίπτωση, η K_m είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με το *PvGSTU8.2*. Το BDNB εμφανίζει συνήθως δραστηριότητα παρόμοια με αυτή του πρότυπου υποστρώματος, δηλαδή του CDNB (Chronopoulou *et al.*, 2014; Perperopoulou *et al.*, 2016). Επειδή το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εμφάνισε δράση υπεροξειδάσης, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση έχοντας το CuOOH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Η K_m και ως προς τα δύο υποστρώματα (CuOOH/GSH) είναι η ίδια και σχετικά υψηλή, σύμφωνα με το εύρος των τιμών της K_m (Perperopoulou *et al.*, 2016), γεγονός που υποδεικνύει πως δεν υπάρχει ισχυρή συγγένεια με το CuOOH.

Επιπλέον και τα τρία ισοένζυμα εμφάνισαν δραστηριότητα με το NBD-chloride και πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση. Όσο αναφορά στο *GmGSTU5-5* εμφανίζει πολύ μικρή K_m με το NBD-chloride, γεγονός που υποδεικνύει υψηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος (Rouliou *et al.*, 2017). Έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH, η K_m είναι περίπου 2,5-φορές μεγαλύτερη. Αντίθετα, η σταθερά εξειδίκευσης ως προς τη GSH εμφανίζεται να είναι σχεδόν διπλάσια σε σχέση με το άλλο υπόστρωμα (NBD-chloride). Και στην περίπτωση των *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* οι τιμές της K_m για το NBD-chloride και τη GSH, είναι σχετικά χαμηλές (Skopelitou *et al.*, 2017).

Το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* ελέγχθηκε ως προς διάφορα υποστρώματα, τα οποία είναι ανάλογα της GSH, για να διαπιστωθεί εάν παρουσιάζει δράση με αυτά. Πιο συγκεκριμένα, η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου εμφανίζεται υψηλότερη με τη GSH, παρά με τα άλλα υποστρώματα θειόλης, υποδηλώνοντας ότι η GSH προτιμάται έναντι των άλλων πέντε αναλόγων ως υπόστρωμα θειόλης. Γενικά, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* εμφάνισε ευρεία εκλεκτικότητα καθώς έδειξε δράση με όλα τα ανάλογα

θειόλης, συμπεριλαμβανομένων των διπεπτιδίων κυστεΐνης γ -Glu-Cys και Cys-Gly καθώς επίσης και το αμινοξύ L-Cys και το ανάλογο του N-ακετύλιο -L-κυστεΐνη.

Οι φυτικές GSTs θεωρούνται ικανές να δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, φλαβονοειδών, ανθοκυανινών, ορμονών, φυτοαλεξινών, πορφυρινογόνων και άλλων μεταβολιτών (Dixon *et al.*, 2009, 2010; Ahmad *et al.*, 2017). Αυτές οι ενώσεις δεσμεύονται στην L-θέση που σχηματίζεται σε μια ξεχωριστή περιοχή ή επικαλύπτει τις G- και H-θέσεις. Η διευκόλυνση της μεταφοράς μεταβολιτών μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων ή η αποθήκευσή τους είναι πιθανώς οι κεντρικοί ρόλοι της L-θέσης (Cummins *et al.*, 2011; Lallement *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2017). Το *GmGSTU5-5* φαίνεται να είναι ικανό να δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων. Εμφανίζει συγγένεια σχεδόν προς όλες τις προς μελέτη ενώσεις. Μεταξύ όλων των φυσικών προϊόντων, η κερσετίνη εμφανίζει την υψηλότερη ισχύ παρεμπόδισης και ακολουθεί η ρεσβερατρόλη, το ελλαγικό οξύ, η κουρκουμίνη, η πολυδατίνη και η σαφρανάλη. Επίσης, μέτρια ισχύ παρουσιάζουν η (\pm)-υδρο-ταξφολίνη, η (\pm)-ναριγενίνη, η (-)-επιγαλλοκατεχίνη και η πιπερλονγκουμίνη (Pouliou *et al.*, 2017). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα πρόσδεσης φυσικών προϊόντων στην L-θέση είναι η μελέτη του Edwards και των συνεργατών του. Αυτοί μελέτησαν την πρόσδεση φλαβονοειδών και συγκεκριμένα της κερσετίνης στις GSTs της *lambda* τάξης (Edwards *et al.*, 2010).

Μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των φυτικών ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* σε ένα εύρος θερμοκρασιών που κυμαινόταν από τους 4-90 °C. Όπως παρατηρούμε το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* παρουσιάζει σημείο τήξεως στους 71,8 °C, θερμοκρασία σχετικά υψηλή για τις GSTs. Η θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε και μέσω της διαφορικής σάρωσης φθορισμού (Lea and Simeonov, 2012; Perperopoulou *et al.*, 2016). Σύμφωνα με μελέτες, οι GSTs εμφανίζουν σημείο τήξεως περίπου στους 35-45 °C, δηλαδή δεν εμφανίζονται να είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερές (Hassan *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2016). Από την άλλη μεριά, τα ισοένζυμα *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2* εμφανίζουν χαμηλότερο σημείο τήξεως σε σχέση με το *GmGSTU5-5*. Πιο συγκεκριμένα, το *PvGSTU8.1* παρουσιάζει σημείο τήξεως τους 66,4 °C και το *PvGSTU8.2* περίπου δέκα βαθμούς μικρότερο, στους 54,1 °C.

Επιπλέον, μελετήθηκε η εξάρτηση της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης έναντι της θερμοκρασίας και του pH. Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της αντίδρασης. Η θερμοκρασία της ενζυμικής αντίδρασης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξή της. Αυτό συμβαίνει γιατί σε χαμηλή θερμοκρασία η μετουσίωση των περισσότερων ενζύμων πραγματοποιείται με πολύ αργό ρυθμό σε σχέση με μια υψηλότερη θερμοκρασία (Wan *et al.*, 2016, 2018). Επιπλέον, η εξάρτηση της ενζυμικής αντίδρασης από το pH σχετίζεται με την παρουσία ιονιζόμενων ομάδων στο ένζυμο. Οποιαδήποτε αλλαγή στην τιμή του pH, προκαλεί αλλαγή στην ιοντική κατάσταση των συστατικών του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (Tharuka *et al.*, 2017). Επίσης, η αλλαγή του pH επιδρά στην πρωτεϊνική δομή του ενζύμου με αποτέλεσμα την τοπική μεταβολή της στερεοδιάταξης των υπομονάδων (Cook and Cleland, 2007). Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα GSH/CDNB. Το θερμοκρασιακό εύρος που μελετήθηκε ήταν από 0 - 90 °C. Αναλυτικότερα, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* φαίνεται να εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία στους 65 °C, το *PvGSTU8.1* στους 75 °C ενώ το *PvGSTU8.2* δεκαπέντε βαθμούς χαμηλότερη, στους 60 °C. Και τα τρία ισοένζυμα έχουν βέλτιστη θερμοκρασία πέραν των αναμενόμενων ορίων για τις GSTs, γεγονός που επιβεβαιώνεται από πολλές μελέτες (Cui *et al.*, 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα πρόσφατα χαρακτηρισμένο ισοένζυμο της *epsilon* τάξης, όπου εμφάνισε βέλτιστη θερμοκρασία στους 40 °C (Wan *et al.*, 2016). Για να αναλύσουμε την επίδραση της θερμοκρασίας στη V_{max} των ισοενζύμων *GmGSTU5-5*, *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *Arrhenius*. Υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης για όλα τα ισοένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, το ισοένζυμο *GmGSTU5-5* παρουσιάζει ενέργεια ενεργοποίησης ίση με 25,5 Jmol⁻¹K⁻¹, το *PvGSTU8.1* ίση με 12,28 Jmol⁻¹K⁻¹ και το *PvGSTU8.2* ίση με 8,539 Jmol⁻¹K⁻¹, υποδεικνύοντας ότι διάφοροι τύποι καταλυτικών συμπλοκών συνέβαλαν στον σχηματισμό μεταβατικής κατάστασης (Skopelitou *et al.*, 2015, 2016; Young *et al.*, 2017). Όσον αφορά στο pH το *GmGSTU5-5* και το *PvGSTU8.2* εμφανίζουν βέλτιστο pH περίπου στο 7 ενώ το *PvGSTU8.1* στο 6,6.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ελέγχθηκαν ως δυνητικοί αναστολείς των ισοενζύμων *PvGSTU8.1* και *PvGSTU8.2*. Από τα αποτελέσματα της σάρωσης προέκυψε ότι και τα δύο ισοένζυμα παρουσιάζουν ευρεία εκλεκτικότητα δέσμευσης φυτοπροστατευτικών γεγονός που τα καθιστά ισχυρούς υποψηφίους για τη δημιουργία

ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ουσιών. Πολλές μελέτες βιοαισθητήρων έχουν δημοσιευθεί με τη συγκεκριμένη ιδιότητα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι οπτικοί βιοαισθητήρες που βασίζονται στις GSTs. Αυτοί είναι κατασκευασμένοι για να ανιχνεύουν μια ποικιλία φυτοφαρμάκων όπως το μαλαθείο (Karoli *et al.*, 2008), τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Dowd *et al.*, 2010), την ατραζίνη (Andreou and Clonis, 2002), το καπτάν (Singh *et al.*, 2009, Choi *et al.*, 2003). Άλλο παράδειγμα αποτελεί η μεταλλαγμένη Gln53Ala της GST I της phi τάξης από το φυτό *Zea mays* όπου πραγματοποιήθηκε έρευνα για την ανάπτυξη ενός ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα για τις μετρήσεις του μαλάθειου σε νερό (Karoli *et al.*, 2008). Επίσης, ο Oliveira και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα βασισμένο σε GST για τον ποσοτικό προσδιορισμό του molinate σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού (Oliveira *et al.*, 2013).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοϋπολογιστική ανάλυση και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας των ισοενζύμων PnGSTU8.1 και PnGSTU8.2. Τα διμερή αποτελούνται από δύο υπομονάδες που σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα (Parbhoo, 2013). Ένα εμφανές χαρακτηριστικό των διμερών είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό των μορίων, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια (Board and Menon, 2013). Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η μεγάλη οπή που επιτρέπει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στα ενεργά κέντρα των ισοενζύμων (Cummins *et al.*, 2011; Shaokui, 2012; Cho *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

Για να κατανοηθούν οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του ισοενζύμου GmGSTU5-5 χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα PYMOL. Το GmGSTU5-5 αποτελείται από τη N-τελική και τη C-τελική δομική περιοχή όπου συνδέονται με ένα σύντομο βρόγχο που βρίσκεται στο άκρο της α3 α-έλικας. Η C-τελική δομική περιοχή αποτελείται από τέσσερις α-έλικες, τις α4, α5, α6 και α7 ενώ η N-τελική δομική περιοχή αποτελείται από τις α-έλικες α1, α2 και α3.

Τα αποτελέσματα με το πρόγραμμα CASTp έδειξαν την παρουσία μιας μεγάλης κοιλότητας σε κάθε υπομονάδα με εμβαδόν 650 Å² και όγκο 834,9 Å³ που επικαλύπτει την G- και H-θέση. Το μέγεθος αυτής δείχνει ότι είναι αρκετά μεγάλο για να φιλοξενήσει μεγάλου μοριακού μεγέθους υποστρώματα και αναστολείς, γεγονός που εξηγεί την ευρεία εκλεκτικότητα που εμφανίζει το συγκεκριμένο ισοένζυμο. Η δεύτερη

κοιλότητα που υπάρχει, είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και καταλαμβάνει σημαντικά μικρότερο μέγεθος σε σχέση με την προηγούμενη, εμβαδόν $414,9 \text{ \AA}^2$ και όγκο $698,1 \text{ \AA}^3$.

Κεφάλαιο 5

*Μελέτη των GSTA1-1 και GSTP1-1
ισοενζύμων από Mus musculus*

5.1 Εισαγωγή

Οι GSTs έχουν βρεθεί σε πολλά είδη συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, αρουραίων, βακτηρίων, ζυμομυκήτων, κουνουπιών, εντόμων, φυτών, ψαριών και πουλιών (Landi, 2000; Sheedan *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2005). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές οικογένειες των GSTs, οι κυτταροπλασματικές, οι μιτοχονδριακές, οι MAPEG και οι μικροσωμικές GSTs (Flanagan and Smythe, 2011). Οι GSTs έχουν ταξινομηθεί σε οικογένειες με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία. Τα ισοένζυμα μέσα σε μια κλάση παρουσιάζουν περισσότερο από 40 % ομοιότητα και μεταξύ των οικογενειών λιγότερο από 25 % (Yadav *et al.*, 2010; Flanagan and Smythe, 2011; Qin *et al.*, 2012).

Οι κυτταροπλασματικές GSTs των θηλαστικών μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες εξελικτικές ομάδες (Oakley, 2011). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις *sigma*, *alpha*, *mi* και *pi*. Οι παραπάνω οικογένειες εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με το CDNB και εμφανίζουν ένα κατάλοιπο τυροσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που λειτουργεί σταθεροποιητικά για την ομάδαθειόλης της GSH. Η κλάση *alpha* (GSTA) περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε μέλη, GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4 και GSTA5 (Hayes *et al.*, 2005), όπου οι GSTA1-1 και GSTA2-2 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ, το έντερο, τους νεφρούς, τα επινεφρίδια και τους όρχεις και η GSTA3 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς (Coles and Kadlubar, 2005). Από την άλλη, η κλάση *pi* περιέχει μόνο ένα μέλος (GST P1) ενώ η κλάση *mi* απαριθμεί πέντε μέλη (M1, M2, M3, M4 και M5) (Sheehan *et al.*, 2001). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις κλάσεις *omega*, *zeta* και *theta*, οι οποίες εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια προς το CDNB και στερούνται του καταλοίπου τυροσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου έτσι ώστε το ένζυμο να παρουσιάζει χαμηλή δραστηριότητα με τη GSH (Oakley, 2011).

Λόγω της σύνδεσής τους με την τοξικολογία, τον καρκίνο και τον μεταβολισμό των φαρμάκων, οι κυτταροπλασματικές GSTs των θηλαστικών (ειδικότερα τα ισοένζυμα *alpha*, *mi* και *pi*) ήταν μεταξύ των πρώτων που χαρακτηρίστηκαν δομικά. Η πρώτη δομή που προσδιορίστηκε ήταν του ενζύμου *pi* του χοίρου (pGSTP1-1) (Reinemer *et al.*, 1991). Άλλη κρυσταλλοδομή ήταν αυτή των ισοενζύμων A1-1 και A2-2 του μύινα (είδος τρωκτικού) (Gu *et al.*, 2003).

Εκτός από τις καταλυτικές αντιδράσεις σύζευξης, αναγωγής και ισομερισμού, οι κυτταροπλασματικές GSTs επίσης δεσμεύουν, ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά, υδρόφοβες ενώσεις (Fujikawa *et al.*, 2008; Axarli *et al.*, 2009; Oakley, 2011; Labrou *et al.*, 2015). Αυτή η δράση συμβάλλει στην ενδοκυττάρια μεταφορά, απομόνωση και διάθεση ξενοβιοτικών ενώσεων και ορμονών. Τέτοιες ενώσεις είναι τα αζωχρώματα, η χολερυθρίνη, η αίμη, τα PAH, τα στεροειδή και οι θυρεορρομόνες (Axarli *et al.*, 2009). Η πλειοψηφία των κυτταροπλασματικών GSTs βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, η GSTA4-4 ποντικού και ανθρώπινου έχει συσχετιστεί με το μιτοχόνδριο και τις μεμβράνες (Gardner and Gallagher, 2001; Raza *et al.*, 2002; Robin *et al.*, 2003), όπως και η GSTM1-1 ποντικού (Raza *et al.*, 2002). Στην περίπτωση του GSTA4-4, αυτό συνεπάγεται φωσφορυλίωση (Robin *et al.*, 2003). Οι μιτοχονδριακές GSTs της κλάσης *kappa* των θηλαστικών αποτελούνται μόνο από μία κλάση (Hayes *et al.*, 2005). Αυτή απομονώθηκε για πρώτη φορά από τμήμα συκωτιού του αρουραίου (Morel and Aninat, 2011).

Στα μικρόβια, στα φυτά, στα ψάρια και στα θηλαστικά, η έκφραση των GSTs ρυθμίζεται από την έκθεσή τους σε οξειδωτικά (Desikan *et al.*, 2001; Veal *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002; Allocati *et al.*, 2003; An and Blackwell, 2003; Leiers *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Labrou *et al.*, 2015). Αύξηση της δραστηριότητας των GSTs παρατηρείται επίσης σε ζώα που υφίστανται παρατεταμένο λήθαργο ή χειμερία νάρκη (Manikandan *et al.*, 2004; Tew and Townsend, 2011). Συνολικά παρατηρείται ότι η επαγωγή των GSTs είναι μια εξελικτικά διατηρημένη απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες (Singhal *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Labrou, 2015; Hecht *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017).

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Βιολογικά υλικά

Το RNA που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των γονιδίων είναι μια ευγενική προσφορά της κυρίας Ελένης Ντούνη, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του τμήματος Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.

5.2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.

5.2.2 Μέθοδοι

5.2.2.1 κατεργασία δειγμάτων με νουκλεάση DNase I

RNA από *Mus musculus* ακολούθησε κατεργασία με DNase I, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη χρωμοσωμικού DNA. Προκειμένου, λοιπόν, να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA χρησιμοποιείται RNase-free DNase σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου erpendorf προστίθενται κατάλληλα ποσότητα RNA, DNase I και το αντίστοιχο ρυθμιστικό της διάλυμα, η RNase καθώς και αποστειρωμένο νερό. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C, προσθήκη νερού και PIC. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντριση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο. Προστίθεται 1:1 CHCl₃, ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 rpm και μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf. Προστίθεται CH₃COONa pH 5,2 καθώς και 2,5-φορές ο αρχικός όγκος σε αιθανόλη. Το διάλυμα αντίδρασης αφήνεται σε ηρεμία στους -20 °C για 24 h. Την επόμενη μέρα μεταφέρεται στους -80 °C για 30 min και ακολουθεί φυγοκέντριση και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Προστίθεται 70 % αιθανόλη (v/v) και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm. Τα φιαλίδια τύπου erpendorfs μένουν στους 4 °C για ~30 min να στεγνώσουν. Τέλος, επαναδιαλύεται το ίζημα με 20 μL αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού.

5.2.2.2 Σύνθεση cDNA

Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου erpendorf προστίθενται το ολικό RNA που συλλέχθηκε από τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην προηγούμενη παράγραφο, oligo(dT) 12-18 και dNTP mix. Ακολουθεί θέρμανση στους 65 °C για 5

min και τοποθέτηση των δειγμάτων απ' ευθείας στον πάγο. Μετά από γρήγορη φυγοκέντρηση προστίθενται διάλυμα first-strand, DTT και RNase Out. Έπειτα από απλή ανάδευση επωάζονται στους 42 °C. Προστίθεται Superscript II RT και αναδεύονται απαλά. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση στους 42 °C και τέλος, στους 70 °C ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

5.2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για ενίσχυση του cDNA

Για να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση των cDNA των ισοενζύμων *MmGSTA1-1*, *MmGSTP1-1* έλαβε χώρα η ακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση υψηλής πιστότητας (High Fidelity) για την ελαχιστοποίηση των λαθών κατά την αντιγραφή. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* είναι οι ακόλουθες:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
2x διάλυμα αντίδρασης	25
dNTPs (50 mM)	0,5
5' GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATG GCC GGG AAG CCC GTG CTT CAC 3' (10 pmol/μL)	1
5' GTG ATG GTG GTG ATG ATG TTA TCA CTG AAT CTT GAA AGC CTT CCT TGC TTC 3' (10 pmol/μL)	1
Accura High-Fidelity πολυμεράση	1
cDNA	1
Δις απιονισμένο νερό	20,5
Τελικός όγκος	50

Οι θερμοκύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι οι ακόλουθοι:

Αρχική Αποδιάταξη	Στους 94 °C για 30 s
25 κύκλοι	Αποδιάταξη στους 94 °C για 45 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 63 °C για 15 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
Τελική Επιμήκυνση	Στους 72 °C για 10 min

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για το ισοένζυμο *MmGSTP1-1* είναι οι ακόλουθες:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
2x διάλυμα αντίδρασης	25
dNTPs (50 mM)	0,5
5' GAA GGA GAT ATA CAT ATG CCA CCA TAC ACC ATT GTC TAC TTC 3' (10 pmol/μL)	1
5' GTG ATG GTG GTG ATG ATG CTA CTG TTT GCC ATT GCC ATT GAT GGG 3' (10 pmol/μL)	1
Accura High-Fidelity πολυμεράση	1
cDNA	1
Δις απιονισμένο νερό	20,5
Τελικός όγκος	50

Οι θερμοκύκλοι που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι οι ακόλουθοι:

<i>Αρχική Αποδιάταξη</i>	Στους 94 °C για 30 s
<i>25 κύκλοι</i>	Αποδιάταξη στους 94 °C για 45 s
	Υβριδισμός εκκινητών στους 65 °C για 15 s
	Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	Στους 72 °C για 10 min

Τα προϊόντα των PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1 % και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα.

5.2.2.4 Μετασηματισμός κυττάρων HI-Control 10G με πλασμιδιακό DNA για τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*

Για το μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε 100 μL δεκτικών κυττάρων προστίθενται 2 μL πλασμιδιακού DNA *MmGSTA1-1* και *MmGSPA1-1*. Αφού αναμιχθούν με ήπιο τρόπο, το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων με επώασή τους στους 42 °C για 90 s και έπειτα αφήνονται στον πάγο για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μL θρεπτικού μέσου LB και το

μίγμα αφού αναμιχθεί καλά επωάζεται στους 37 °C για 1 h. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντριση στις 2.000 rpm για 2 min προκειμένου να συγκεντρωθούν τα κύτταρα σαν ίζημα στο φιαλίδιο τύπου erpendorf. Αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και προστίθεται περίπου 80-100 μ L φρέσκου θρεπτικού μέσου (LB) όπου και επαναδιαλύονται με ήπιο τρόπο τα κύτταρα. Η ποσότητα αυτή του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, όπου υπάρχει και ως μέσο επιλογής η καναμυκίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στη συνέχεια στους 37 °C για 12-16 h.

5.2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και προσδιορισμός της αλληλουχίας των ισοενζύμων

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, του οίκου Macherey-Nagel και εν συνεχεία στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρεία MWG Biotech AG. Κατόπιν ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με την § 2.2.3 που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

5.2.2.6 Ετερολόγος έκφραση των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* σε βακτήρια *E. coli* του στελέχους HI-Control BL21 (DE3)

Για την έκφραση των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* μετασχηματίστηκαν κύτταρα από τα στελέχη του βακτηρίου *E. Coli* HI-Control BL21 (DE3). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν θρεπτικό υλικό μέσο, η σύσταση του οποίου ήταν: 1 % (w/v) πεπτόνη, 1 % (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης. Σε μικρή κωνική φιάλη προκαλλιέργειας (50 mL) προσθέτουμε ως αντιβιοτικό επιλογής καναμυκίνη (30 mg/mL) για την κυτταρική καλλιέργεια *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pETite C-His καθώς και ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικρές κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37 °C για 14-16 h υπό συνεχή ανάδευση, στις 180 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται 500 μ L σε φιαλίδιο τύπου erpendorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500 μ L διάλυμα γλυκερόλης 50 % (v/v). Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί ωσμωτικό σοκ στα κύτταρα και έπειτα αποθηκεύονται στους -80 °C. Μετά το πέρας, προστίθεται το αντίστοιχο αντιβιοτικό στη μεγάλη κωνική (450 mL), εμβολιάζω με τη μικρή φιάλη προκαλλιέργειας και την τοποθετώ στον επωαστήρα, στους 37 °C. Η έκφραση των γονιδίων επάγεται με προσθήκη ισοπροπυλο- β -D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG)

όταν η οπτική απορρόφηση των καλλιιεργειών είναι 0,6 (600 nm) ύστερα από συνεχή ανάδευση και επώαση για 4 h. Έπειτα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε falcons έτσι ώστε να συλλέξουμε την πάστα μετά από φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, στους 4 °C για 20 min.

5.2.2.7 Καθαρισμός των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* με χρωματογραφία συγγένειας

Επαναιωρούμε τα κύτταρα της κυτταρικής ‘πάστας’ σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (KH_2PO_4 , 20 mM, pH 7) και θραύουμε τα κύτταρα με χρήση συσκευής υπερήχων έχοντας εμβαπτισμένο το κυτταρικό αιώρημα σε παγόλουτρο. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το επιθυμητό γονίδιο της χρειάστηκαν τέσσερις έως πέντε επαναλήψεις των 10 s η καθεμία για τη θραύση (λύση) των κυττάρων. Φυγοκεντρούμε το τελικό αιώρημα στις 13.000 rpm για 15 min και συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια προσδιορίζουμε φωτομετρικά την ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας το σύστημα GSH/CDNB (§ 2.2.15), καθώς επίσης και τη συνολική πρωτεΐνη (μέθοδος Bradford) (§ 2.2.14). Ακολούθησε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (συγκέντρωσης 20 mM, pH 7) για 18-24 h και επαναπροσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας των ισοενζύμων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο (§ 2.2.13) Η καθαρότητα των εκλούσεων και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % SDS-PAGE), κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (§ 2.2.21).

5.2.2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bradford που περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.14.

5.2.2.9 Προσδιορισμός της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* με ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα

Για τα παράγωγα του 1-αλογονο-2,4 δινιτροβενζολίου (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl) καθώς και το fluorodifen χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένες μέθοδοι (Axarli *et al.* 2009a, Skopelitou *et al.* 2011) ώστε να επιτευχθεί ο φωτομετρικός προσδιορισμός τους, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά σε

παραγράφους προηγούμενου κεφαλαίου (§ 2.2.26 και 2.2.33). Ως προς τη δράση υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικές δοκιμές με υπεροξειδία (CuOOH, tert-BuOOH, benzoyl peroxide) οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στην § 2.2.27. Οι φασματοφωτομετρικές δοκιμές για τα αντιδραστήρια της 2-2 διθειοδιαιθανόλης (HED), του διϋδροασκορβικού οξέος, του αιθακρινικού οξέος (EA), της trans-4φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης, της trans-2 ενενάλης, και των ισοθειοκυανικών εστέρων (PEITC και AITC) περιγράφονται αναλυτικά στις § 2.2.28, 2.2.29, 2.2.30, 2.2.31, 2.2.32.

5.2.2.10 Κινητική μελέτη ισοενζύμων για το σύστημα CDNB/GSH

Κινητική μελέτη των ισοενζύμων έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* (§ 2.2.35), έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, GSH σε σταθερή συγκέντρωση και CDNB μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 22,5 - 2.310 μM για το *MmGSTA1-1* και 60 - 2.310 μM για το *MmGSTP1-1*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

Κινητική μελέτη των ισοενζύμων έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* (§ 2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, CDNB σε σταθερή συγκέντρωση και

GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 1 - 3.000 μM για το *MmGSTA1-1* και 35 - 3.000 μM για το *MmGSTP1-1*. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 6 s και για συνολικό χρόνο 120 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7. Όλες οι τιμές της καταλυτικής σταθεράς υπολογίστηκαν παίρνοντας ως δεδομένο την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου ανά υπομονάδα.

5.2.2.11 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής GST ισοενζύμου

Ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης *MmGSTP1-1* (14 mg) υποβλήθηκε σε διαδικασία κρυσταλλοποίησης για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής από την ομάδα του Δρ. Παπαγεωργίου στο Κέντρο Βιοτεχνολογίας στη Φινλανδία (Turku) με χρήση περίθλασης ακτίνων-Χ.

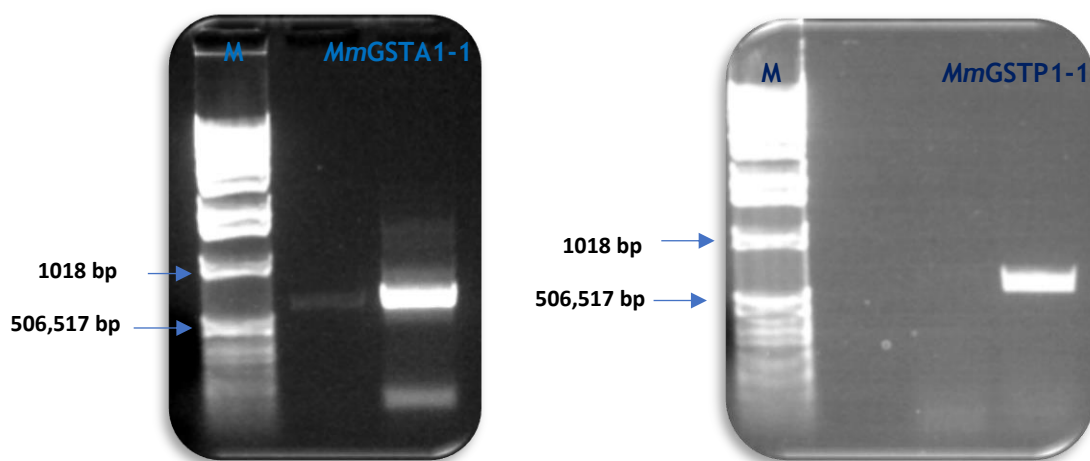
5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Κατεργασία δειγμάτων με νουκλεάση DNase I και σύνθεση cDNA

RNA από *mus musculus* υποβλήθηκε σε κατεργασία με DNase I, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη χρωμοσωμικού DNA. Αφού το RNA μετατράπηκε σε cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την PCR που πραγματοποιήθηκε για να ενισχυθούν τα ισοένζυμα των γονιδίων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*.

5.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των cDNA των ισοενζύμων

Για την ενίσχυση του cDNA των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* πραγματοποιήθηκε PCR. Αρχικά, έγινε σύνθεση εκκινητών που να φέρουν κολλώδη άκρα. Ως μήτρα, χρησιμοποιήθηκε το cDNA που προέκυψε από τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στις § 2.2.6 και § 2.2.7. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στον pETite C-His vector και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (Εικόνα 5.1). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 24 h. Έπειτα, επιλέχθηκε εκείνη η αποικία με την καλύτερη ενζυμική δραστικότητα και αλληλουχίστηκε το πλασμιδιακό DNA έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του γονιδίου.

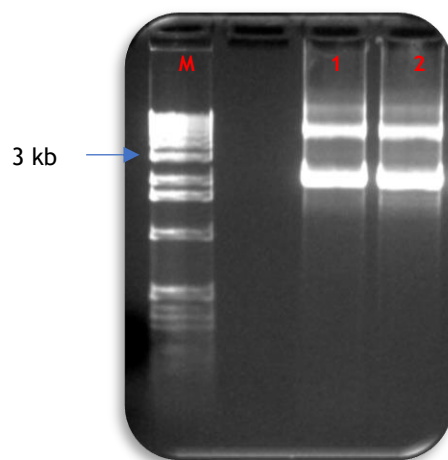


Εικόνα 5.1: PCR με χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για τα γονίδια *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

5.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των γονιδίων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*

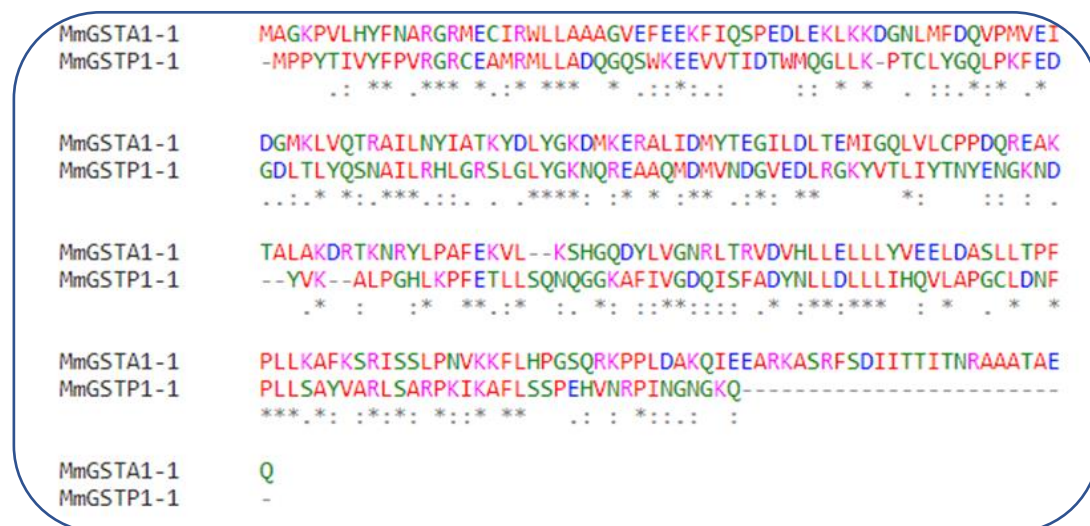
Με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (§ 2.2.2), απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τα πλασμίδια pETite C-*MmGSTA1-1* και pETite C-*MmGSTP1-1*. Μετά την ολοκλήρωση

της διαδικασίας, το προϊόν κάθε απομόνωσης αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1 % (w/v) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.2.



Εικόνα 5.2: Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδιακών DNA του γονιδίου (1) *MmGSTA1-1* και του (2) *MmGSTA1-1* κατόπιν απομόνωσης τους με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης σε πηκτή αγαρόζης (1 % w/v). Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-Log DNA Ladder (Biolabs).

Τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* αλληλουχίστηκαν και αποτελούνται από 717 και από 630 βάσεις, αντίστοιχα, κωδικοποιώντας πολυπεπίδια των 239 και 210 αμινοξέων (Εικόνα 5.3). Παρακάτω παρουσιάζονται, με γραμμική στοίχιση, οι αλληλουχίες των δύο ισοενζύμων σύμφωνα με το πρόγραμμα Clustal Omega. Παρατηρούμε πως η ομοιότητα των δύο ισοενζύμων είναι εξαιρετικά μικρή.



Εικόνα 5.3: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών μέσω του προγράμματος ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*.

Στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο των ισοενζύμων καθώς και το θεωρητικό μοριακό τους βάρος (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1: Θεωρητικός υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου και μοριακού βάρους με τη χρήση του EXPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Ένζυμο	Θεωρητικό pI	Θεωρητικό MB (Da)
<i>MmGSTA1-1</i>	8,69	27.239,74
<i>MmGSTP1-1</i>	7,69	23.609,18

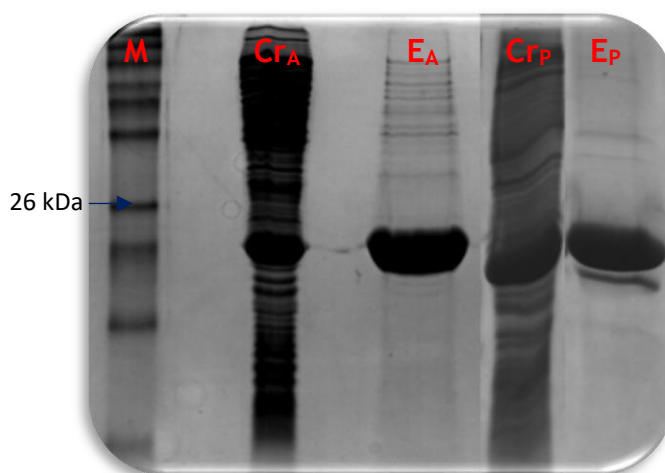
5.3.4 Έκφραση και καθαρισμός των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των ισοενζύμων με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* HI Control BL21(DE3) με πλασμιδιακό DNA (§ 2.2.3). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C με θρεπτικό μέσο λακτόζης, έχοντας ως αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη και για τα δύο ισοένζυμα. Μετά το πέρας, των 24 h κατάλληλη ποσότητα κυττάρων λύεται με τη βοήθεια υπερήχων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προκύπτει, μετά τη φυγοκέντριση, φορτώνεται σε κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας (§ 2.2.13).

Τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 101 % και 123 %, αντίστοιχα (Πίνακας 5.2). Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων και η καθαρότητα τους (Εικόνα 5.4).

Πίνακας 5.2: Απόδοση καθαρισμού από τη χρωματογραφία συγγένειας για κάθε ισοένζυμο.

Ένζυμο	Απόδοση καθαρισμού (%)
<i>MmGSTA1-1</i>	101
<i>MmGSTP1-1</i>	123



Εικόνα 5.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (15 % w/v) παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. M: Protein Marker Broad Range (Biolabs), Cr_A: πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) πριν τον καθαρισμό για το *MmGSTA1-1*, E_A: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλουσης για το *MmGSTA1-1*, Cr_P: πρωτεϊνικό εκχύλισμα (crude) πριν τον καθαρισμό για το *MmGSTP1-1*, E_P: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα έκλουσης για το *MmGSTP1-1*.

5.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*

Τα ισοένζυμα, πλέον σε καθαρές μορφές, μελετήθηκαν ως προς την εκλεκτικότητα διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρώματα για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν και άλλες δράσεις τους όπως υπεροξειδάσης (GPx), ισομεράσης ή δράση θειολοτρανσφεράσης.

Το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* καταλύει δεκατέσσερα υποστρώματα σε σύνολο είκοσι, ενώ το *MmGSTP1-1* καταλύει δώδεκα από τα είκοσι υποστρώματα.

Τα ισοένζυμα, παρόλο που καταλύουν περίπου τον ίδιο αριθμό υποστρωμάτων, δεν παρουσιάζουν παρόμοια εκλεκτικότητα. Αρχικά, το *MmGSTA1-1* εμφανίζει καταλυτική δράση με όλες τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και τα ανάλογα του, 1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (pNBC) και 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο. Επιπλέον, το *MmGSTP1-1* εμφανίζει καταλυτική δράση με όλες τις παραπάνω ενώσεις εκτός από το 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο. Πιο συγκεκριμένα, το FDNB αποτελεί το καλύτερο υπόστρωμα και για τα δύο ισοένζυμα. Για το *MmGSTA1-1*, η ειδική δραστηριότητα είναι 14-φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το CDBN, που αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα για τις GSTs, ενώ για το *MmGSTP1-1* είναι 13-φορές μεγαλύτερη. Επίσης, αξιολογή ειδική

δραστικότητα εμφανίζουν και τα δύο ισοένζυμα έναντι του BDNB, περίπου 2-φορές μεγαλύτερη από το CDNB (Πίνακας 5.3).

Τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* εξετάστηκαν για το εάν εμφανίζουν δράση υπεροξειδάσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, tert-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου (Πίνακας 5.3). Είναι γνωστό ότι οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας οξειδωτικής καταπόνησης, καταλύοντας τις GSH-εξαρτώμενες αντιδράσεις που αδρανοποιούν τα οργανικά υπεροξειδία, μετατρέποντας τα σε μη τοξικές αλκοόλες (Labrou *et al.*, 2015). Το tert-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου φαίνεται να μην αποτελεί αποδεκτό υπόστρωμα για κανένα από τα δύο ισοένζυμα. Το υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου φαίνεται αρκετά ικανοποιητικό υπόστρωμα για το *MmGSTA1-1* ενώ για το έτερο ισοένζυμο η δράση του είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη. Τέλος, το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου αποτελεί υπόστρωμα μόνο για το *MmGSTP1-1*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* φαίνεται να καταλύουν την αντίδραση προσθήκης τηςθειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα). Πιο συγκεκριμένα το *MmGSTA1-1* εμφανίζει διπλάσια ειδική δραστικότητα, σε σχέση με το CDNB, με τον ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα ενώ το *MmGSTP1-1* περίπου τη μισή. Επιπλέον, το *MmGSTA1-1* εμφανίζει χαμηλή ειδική δραστικότητα με το αιθακρινικό οξύ. Αντίθετα, το *MmGSTP1-1* εμφανίζει ειδική δραστικότητα με τη βρωμοσουλφοφθαλείνη.

Στον παρακάτω Πίνακα εμφανίζεται η *ειδική δραστικότητα (%)* την οποία παρουσίασαν τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* έναντι των διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.3: Ειδική δραστηριότητα (%) των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* ως προς διαφορετικά ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων, με απόκλιση λιγότερη του 5 % για όλες τις περιπτώσεις. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστηριότητα που εμφάνισε τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* έναντι του CDNB.

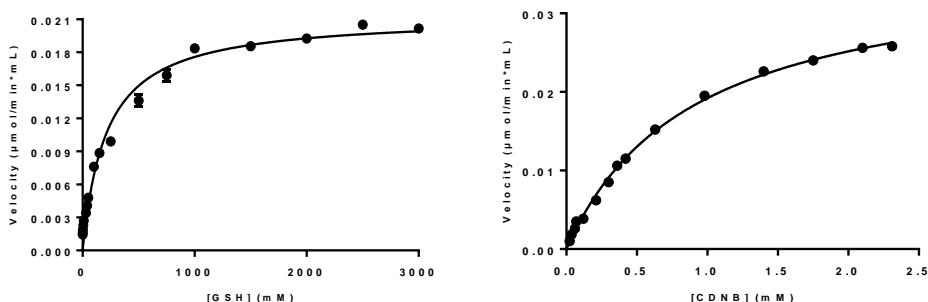
Υποστρώματα	<i>MmGSTA1-1</i>	<i>MmGSTP1-1</i>
1-χλωρο-2,4δινιτροβενζόλιο	100	100
1-βρωμο-2,4δινιτροβενζόλιο	223	188,8
1-φθορο-2,4δινιτροβενζόλιο	1470	1304
1-ιοδω-2,4δινιτροβενζόλιο	7,7	14,4
4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο	38,4	0
π-νιτροβενζυλχλωρίδιο	3,1	1,7
υδροϋπεροξειδιο του κουμενίου	76,9	2,7
tert-βουτυλο υδροϋπεροξειδιο	0	0
βενζοϊκό υδροϋπεροξειδιο	0	54,2
διϋδροασκορβικό οξύ	0	0
2,2-διθειοδιαιθανόλη	7,7	0
fluorodifen	15,4	0
σουλφανιλαμίδη	13	0,2
διϋδροασκορβικό οξύ	0	0
αιθακρινικό οξύ	23,1	19,1
trans-4φαινυλβουτ-3-εν2-όνη	0	0
Ισοθειοκυανικός αλλυλεστερας	1,5	0
ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστερας	200	41,1
βρωμοσουλφοφθαλεινη	0	8,7

5.3.6 Κινητική ανάλυση των ισοενζύμων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* για το σύστημα CDNB /GSH

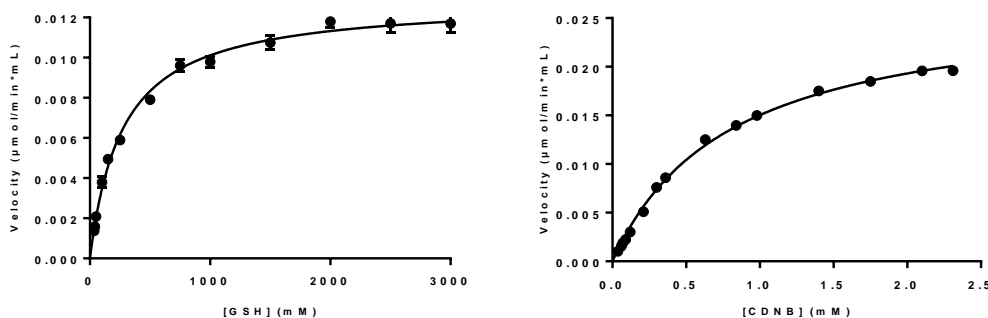
Η ενζυμική κινητική ανάλυση μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης και δίνει πολλά συμπεράσματα για το μηχανισμό της, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται βασικές κινητικές σταθερές (K_m και k_{cat}) και από αυτές γίνεται η εκτίμηση για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση διάφορων μεταβολιτών, τη φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και για τους *in vivo* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων.

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το σύστημα CDNB/GSH και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι, K_m και k_{cat} (Πίνακας 5.4). Και τα δύο ισοένζυμα υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των *Michaelis Menten* και ως προς τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 5.5 και 5.6). Παρατηρούμε πως τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB φαίνεται να έχουν αρκετά υψηλή K_m , γεγονός που φανερώνει πως δεν εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Malik *et al.*, 2016; Perperopoulou *et al.*, 2017). Η σταθερά εξειδίκευσης για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* φαίνεται να είναι περίπου 8-φορές πιο υψηλή σε σχέση με το *MmGSTP1-1*.

Όσον αναφορά στη GSH, ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, και τα δύο ισοένζυμα φαίνεται να έχουν σχετικά μικρή K_m , μέσα στο εύρος τιμών των GSTs (Labrou *et al.* 2004; Axarli *et al.* 2009a, b). Η k_{cat} για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* φαίνεται να είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το *MmGSTP1-1*. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά εξειδίκευσης για το *MmGSTP1-1* είναι περίπου δεκαπέντε φορές μικρότερη σε σχέση με το άλλο ισοένζυμο.



Εικόνα 5.5: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισoenζυμο *MmGSTA1-1*.



Εικόνα 5.6: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισoenζυμο *MmGSTP1-1*.

Πίνακας 5.4: Κινητικές σταθερές για τα ισoenζυμο *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* για το σύστημα CDNB/GSH.

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	CDNB		GSH	
	<i>MmGSTA1-1</i>	<i>MmGSTP1-1</i>	<i>MmGSTA1-1</i>	<i>MmGSTP1-1</i>
K_m (mM)	0,90 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,22 ± 0,01
k_{cat} (min⁻¹)	213,0 ± 5,3	26,8 ± 0,8	453,0 ± 13,6	30,7 ± 4,2

5.3.7 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της πρωτεΐνης *MmGSTP1-1* με την S-(4-νιτροβέλζυλ)-GSH

Το ισoenζυμο *MmGSTP1-1* προέρχεται από το ζωικό οργανισμό *Mus musculus* (οικόσιτος ποντικός). Η αμινοξική του ακολουθία φαίνεται στο Σχήμα 5.1.

MPPYTIVYFPVGRCEAMRMLLADQGSWKEEVVTIDTWMQGLLKPTCLYQQLPKFEDGLTLYQSNAI
LRHLGRSLGLYKGNQREAAQMDMVNDGVEDLRGKYVTLIYTNYENGKNDYVKALPGHLKPFETLLSQN
QGGKAFIVGDQISFADYNLLDLLLIHQVLPAGCLDNFPLLSAYVARLSARPKIKAFLLSPEHVNRPINGNG
KQ

Σχήμα 5.1: Αμινοξική ακολουθία του ενζύμου *MmGSTP1-1*.

Ανάλυση της αλληλουχίας του ενζύμου *MmGSTP1-1* και σύγκρισή της με ισοένζυμα της ίδιας τάξης από άλλους οργανισμούς έδειξε εξαιρετικά υψηλό βαθμό ομοιότητας της με GSTs της *pi* τάξης (Σχήμα 5.2).

```

MUS      MPPYTVVYFFVVRGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVTIDTWMQGLLKPTCLYGQLPKFEDGD
HUMAN    -PPYTVVYFFVVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVVIVETWQEGSLKASCLYGQLPKFQDGD
PONGO    MPPYTVVYFFVVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVVSMETWQEGSLKASCLYGQLPKFQDGD
MACACA   MPPYTVVYFFVVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVVIMETWQEGSLKASCLYGQLPKFQDGD
PAPIO    MPPYTVVYFFVVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVVIMETWQEGSLKASCLYGQLPKFQDGD
          ****:***** *:*****:*** ** :*****:***
MUS      LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKQREAAQMDMVDGVEDLRGKYVTLIYTNYEAGKNDYV
HUMAN    LTLYQSNITILRHLGRITLGLYGKQREAAALVDMVDGVEDLRCKYISLIYTNYEAGKDDYV
PONGO    LTLYQSNITILRHLGRITLGLYGKQREAAALVDMVDGVEDLRCKYLSLIYTNYEAGKDDYV
MACACA   LTLYQSNITFLRHLGRITLGLYGKQREAAALVDMVDGVEDLRCKYLSLIYTNYEAGKDDYV
PAPIO    LTLYQSNITFLRHLGRITLGLYGKQREAAALVDMVDGVEDLRCKYLSLIYTNYEAGKDDYV
          *****:*****:*****:*** :***** **;***** **;***
MUS      KALPGHLKPFETLLSQNQGKAFIVGDQISFADYNLLDLLLIHQVLAPGCLDNFPLLSAY
HUMAN    KALPGQLKPFETLLSQNQGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAY
PONGO    KALPGQLKPFETLLSQNQGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAY
MACACA   KALPGQLKPFETLLSQNQGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAY
PAPIO    KALPGQLKPFETLLSHNQGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAY
          *****:*****:*****:*****:***** *****
MUS      VARLSARPKIKAFLSPEHVNRPINGNGKQ
HUMAN    VGRLSARPKLKAFLASPEYVNLPIGNGKQ
PONGO    VARLSARPKLKAFLASPEHVNLPIGNGKQ
MACACA   VARLSARPKLKAFLASPEHVNLPIGNGKQ
PAPIO    VARLSARPKLKAFLASPEHVNLPIGNGKQ
          *.*****:*****:*** ** *****

```

Σχήμα 5.2: Ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των ισοενζύμων GSTP1-1 διαφόρων οργανισμών μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Clustal W (Clustal W, Thompson *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα: mus (*mus musculus*-οικόσιτος ποντικός), human (*homo sapiens*-άνθρωπος), Pongo (*Pongo abelii*-ουτακοτάγκος της Σουμάτρα), macaca (*Macaca mulatta*-μακάκος ο μουλάτος), Papiro (*Papio anubis*-ελαιόχρωμος μπαμπούνος).

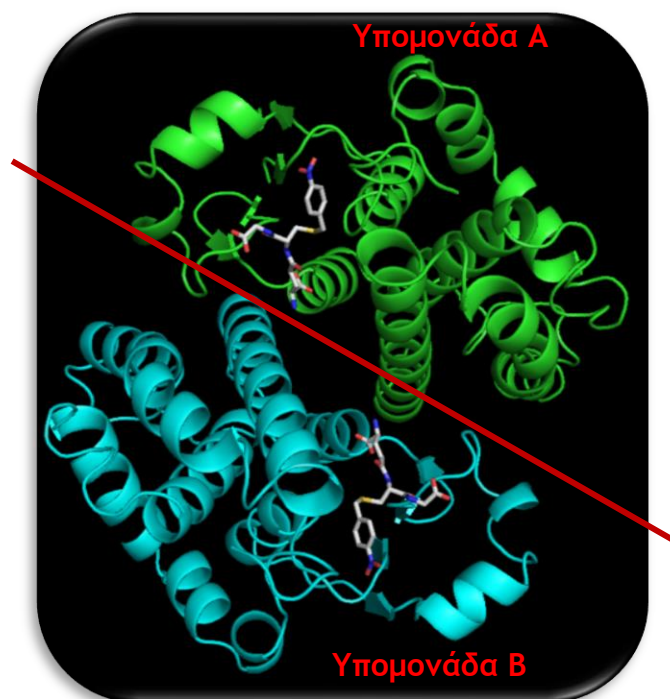
Ο προσδιορισμός της δομής του καθαρού ενζύμου *MmGSTP1-1* με την S-(4-νιτροβένζυλ)-GSH έγινε μέσω κρυσταλλογραφίας περίθλασης ακτίνων-X. Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε από το Κέντρο Βιοτεχνολογίας του Τούρκου στη Φινλανδία από την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εξάτμισης της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop vapor diffusion method) και η δομή προσδιορίστηκε με ανάλυση σε 1,28 Å (Εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7: Παρουσίαση της δομής του *MmGSTP1-1*. Με γαλάζιο αναπαρίστανται οι α -έλικες, με κόκκινα βέλη τα β -ελάσματα και με μωβ οι βρόγχοι. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

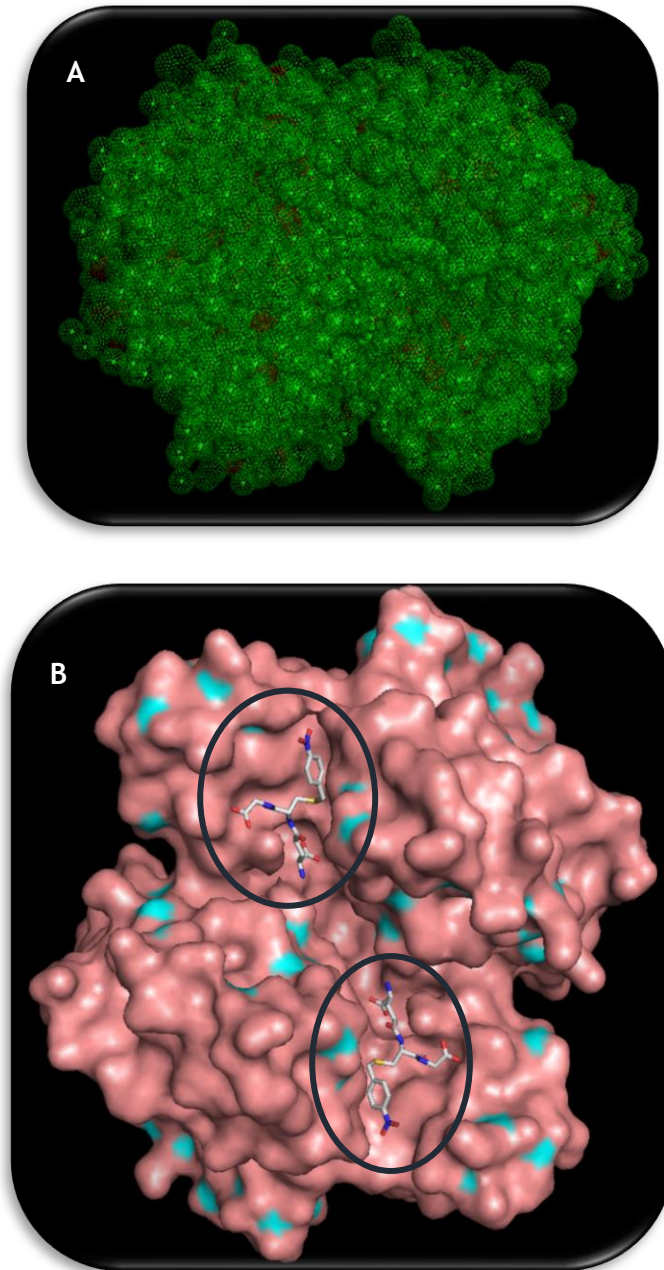
5.3.7.1 Γενικά χαρακτηριστικά της δομής

Η πρωτεΐνη *MmGSTP1-1* κρυσταλλώνεται ως διμερές αποτελούμενο από ένα ομοδιμερές αποτέλεσμα έκφρασης ενός μόνο γονιδίου. Στο διμερές, η κάθε υπομονάδα περιέχει ένα μόριο *S*-(4-νιτροβένζυλ)-GSH δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 5.8).



Εικόνα 5.8: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του *MmGSTP1-1*. Κάθε υπομονάδα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η *S*-(4-νιτροβένζυλο)-GSH αναπαρίσταται με ράβδους σύμφωνα με τον ατομικό της τύπο. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του μονομερούς η πρωτεΐνη αποτελείται από 209 αμινοξέα. Οι δύο υπομονάδες του *MmGSTP1-1* σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 5.9). Ένα εμφανές χαρακτηριστικό του διμερούς είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό του μορίου, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η μεγάλη οπή που επιτρέπει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στα ενεργά κέντρα του ενζύμου.



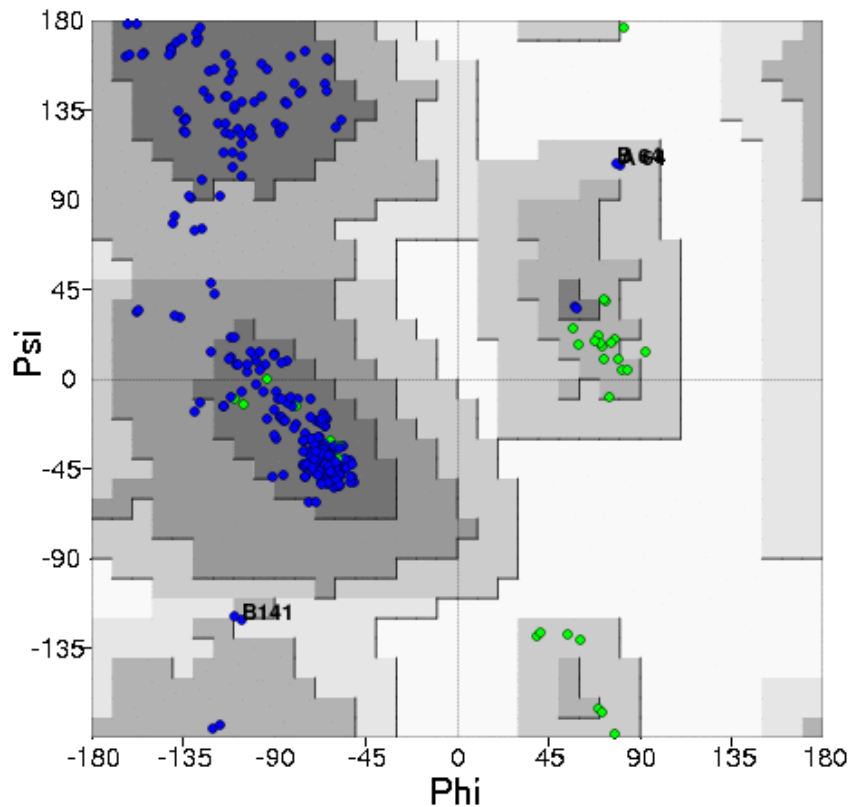
Εικόνα 5.9: (A) Παρουσίαση του σφαιρικού σχήματος του *MmGSTP1-1*. Με πράσινο απεικονίζονται οι α -έλικες και με κόκκινο οι β -πτυχβρές επιφάνειες. (B) Παρουσίαση της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος σε κάθε μία υπομονάδα. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Το διμερές αποτελείται από δύο ανεξάρτητες υπομονάδες που δεν παρουσιάζουν διαφορές στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής τους καθώς και της τριτοταγούς. Έτσι, οι υπομονάδες *A* και *B* αποτελούνται από δύο δομικές περιοχές: τη Ν-τελική, με μοτίβο α/β (ααββα) (κατάλοιπα 1 έως 76) και τη C-τελική δομική περιοχή, με μοτίβο τύπου α (κατάλοιπα 83-200) (Εικόνα 5.9).

5.3.7.2 Οι Φ και Ψ δίεδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού-Διάγραμμα Ramachandran

Στο διάγραμμα Ramachandran φαίνεται ότι τα περισσότερα ζεύγη φ, ψ γωνιών, για όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα εκτός αυτά της γλυκίνης, συναθροίζονται γύρω από τις στερεοδιαταξικά επιτρεπτές περιοχές. Υπάρχει όμως μια σημαντική εξαίρεση, αυτή της γλυκίνης, που μπορεί να υιοθετήσει ένα πιο ευρύ φάσμα στερεοδιατάξεων από ό,τι τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Συνεπώς, παίζει πολύ σημαντικό δομικό ρόλο επιτρέποντας ασυνήθιστες στερεοδιατάξεις της κύριας αλυσίδας. Αυτός είναι και ένας από τους κύριους λόγους που ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των καταλοίπων είναι εξελικτικά συντηρημένα μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνικών αλληλουχιών.

Οι περιοχές στο διάγραμμα Ramachandran ονομάζονται ανάλογα με τη διαμόρφωση που θα αποκτούσε ένα πολυπεπίδιο, εάν οι αντίστοιχες γωνίες φ και ψ επαναλαμβάνονταν σε όλα τα διαδοχικά αμινοξέα κατά μήκος της αλυσίδας. Οι κύριες επιτρεπτές περιοχές είναι η ομάδα των δεξιόστροφων α-ελίκων στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο, η ευρεία περιοχή των β-ελασμάτων (παράλληλων και αντιπαράλληλων) στο επάνω αριστερά τεταρτημόριο και η μικρή περιοχή της αριστερόστροφης α-έλικας στο επάνω δεξιά τεταρτημόριο (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.10: Διάγραμμα Ramachandran για το ενζύμο *MmGSTP1-1*. Τα αμινοξικά κατάλοιπα αναπαρίστανται ως σφαίρες. Οι έγχρωμες περιοχές δείχνουν στερεοχημικά επιτρεπτές περιοχές. Με μπλε αναπαρίστανται οι α-έλικες και με πράσινο τα β-ελάσματα. Οι εξωτερικές γραμμές περικυκλώνουν την περιοχή εντός της οποίας θα πρέπει να βρεθεί 90 % όλων των σφαιρών του ίδιου χρώματος και οι εσωτερικές γραμμές υποδεικνύουν την περιοχή του 50 %. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

5.3.7.3 N-τελική δομική περιοχή

Όσον αφορά τις *υπομονάδες A και B* η N-τελική δομική περιοχή τους αποτελείται από τρεις α-έλικες. Μία μεσαίου μήκους α3 α-έλικα (κατάλοιπο 65 έως 76) και δύο μικρού μεγέθους, την α1 (κατάλοιπα 15 έως 24) και την α2 (κατάλοιπα 35 έως 46). Οι μικρού μεγέθους α-έλικες α1 και α2 χωρίζονται από ένα βρόγχο μικρού μήκους. Για την α1 α-έλικα ο βρόγχος αποτελείται από μόνο ένα κατάλοιπο και την α2 α-έλικα από τρία κατάλοιπα. Η α-έλικα α1 αποτελούμενη από 9 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 13,5 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 3 στροφές. Η α-έλικα α2 αποτελούμενη από 6 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 9 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 1,8 στροφές. Τέλος, η α-έλικα α3 αποτελούμενη από 11 κατάλοιπα έχει συνολικό μήκος 16,5 Å και αντιστοιχεί περίπου σε 3,3 στροφές (Εικόνα 5.11).



Εικόνα 5.11: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς *MmGSTP1-1*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\alpha 1$, $\alpha 2$, και $\alpha 3$ χαρακτηρίζονται οι α -έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Η N-τελική δομική περιοχή αποτελείται από β -φύλλα δηλαδή από τέσσερα β -ελάσματα και επιδεικνύουν μία δεξιόστροφη κάμψη. Τρία μεσαίου μήκους, τα $\beta 1$ (κατάλοιπα 3 έως 7), $\beta 2$ (κατάλοιπα 29 έως 31) και $\beta 3$ (κατάλοιπα 54 έως 57) και ένα μικρότερου $\beta 4$ (κατάλοιπα 60 έως 62). Το έλασμα $\beta 3$ παρατάσσεται αντιπαράλληλα στα άλλα τρία ($\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 4$). Από τη μία πλευρά, τα β -φύλλα περιβάλλονται από τις δύο α -έλικες $\alpha 3$ και $\alpha 2$, από τις οποίες η $\alpha 2$ είναι τοποθετημένη στην περιοχή που είναι εκτεθειμένη προς το διαλύτη (Εικόνα 5.12).

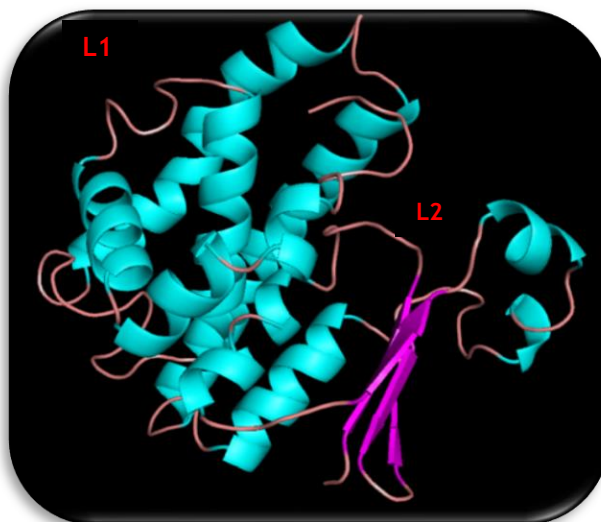
Τα β -ελάσματα στοιχίζονται γειτονικά ο ένας με τον άλλον με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις C=O ομάδες του ενός ελάσματος με τις NH ομάδες του άλλου ελάσματος και αντίστροφα. Τα β -ελάσματα συνδυάζονται σε μεικτή β -πτυχωτή επιφάνεια, με ένα ζεύγος β -ελασμάτων ($\beta 1$ - $\beta 2$) να είναι παράλληλο και δύο αντιπαράλληλα ($\beta 1$ - $\beta 3$ και $\beta 3$ - $\beta 4$). Στον παράλληλο συνδυασμό ($\beta 1$ - $\beta 2$) όλα τα αμινοξέα των β -ελασμάτων έχουν την ίδια κατεύθυνση, από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο ενώ στην αντιπαράλληλη σύνδεση ($\beta 1$ - $\beta 3$ και $\beta 3$ - $\beta 4$) έχουν αντίθετες κατευθύνσεις, δηλαδή το ένα έλασμα κατευθύνεται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο και ο επόμενος από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό.



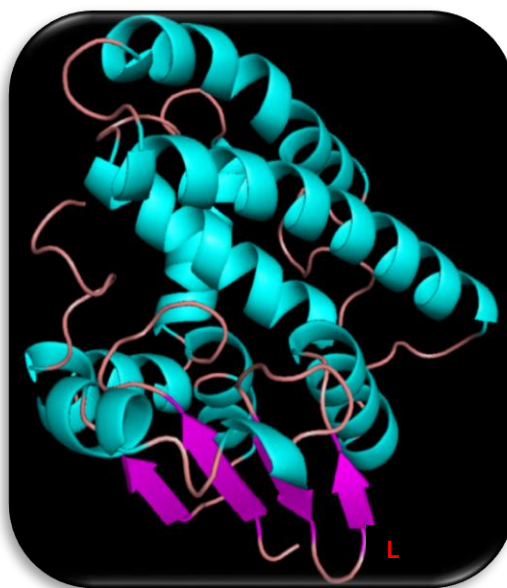
Εικόνα 5.12: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς *MmGSTP1-1*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$ χαρακτηρίζονται τα β -ελάσματα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Οι α -έλικες καθώς κι οι β -πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων (L1 και L2) (Εικόνα 5.13). Βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυναμικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενα β -ελάσματα ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β -φουρκέτας (Εικόνα 5.14).

Τα $\beta 1$ έλασμα συνδέεται με την α -έλικα $\alpha 1$ καθώς και η α -έλικα $\alpha 1$ με το $\beta 2$ έλασμα με ένα μικρό βρόγχο μήκους τεσσάρων καταλοίπων ο καθένας. Το $\beta 2$ έλασμα συνδέεται με την επόμενη α -έλικα $\alpha 2$ με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο επτά καταλοίπων. Η $\alpha 2$ α -έλικα με τον $\beta 3$ με ένα βρόγχο οκτώ καταλοίπων. Η σύνδεση των κλώνων $\beta 3$ και $\beta 4$ εμφανίζεται με το μοτίβο β -φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, το έλασμα $\beta 4$ ενώνεται με την α -έλικα $\alpha 3$ μόνο με 2 κατάλοιπα.



Εικόνα 5.13: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς *MmGSTP1-1*. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως L1 και L2 χαρακτηρίζονται οι βρόγχοι. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

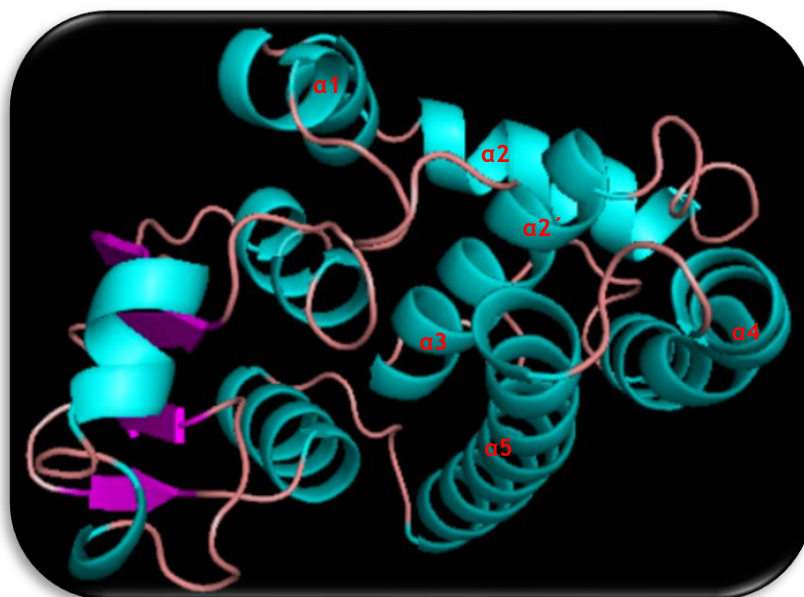


Εικόνα 5.14: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς *MmGSTP1-1*. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως L χαρακτηρίζεται ο βρόγχος φουρκέτας. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

5.3.7.4 C-τελική δομική περιοχή

Η C-τελική δομική ενότητα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή και αποτελείται από τα κατάλοιπα 83 έως 200 και για τις δύο υπομονάδες. Αποτελείται από μοτίβο α-έλικας, με πέντε α-έλικες διευθετημένες σε αριστερόστροφη περιέλιξη.

Η α1 α-έλικα φαίνεται να είναι η πιο μικρή που εμφανίζεται και αποτελείται από πέντε κατάλοιπα (α1: κατάλοιπα 196 έως 200). Η α-έλικα α2 καθώς και η α-έλικα α3 φαίνεται να είναι μεσαίου μεγέθους. Αποτελούνται από 20 και 16 αμινοξικά κατάλοιπα αντιστοίχως (α2: 174-194, α3: 150-165). Οι α2' και α5 α-έλικες εμφανίζουν κατά κάποιο τρόπο κάθετη διευθέτηση μεταξύ τους. Η α-έλικα α2 παρουσιάζει μια απότομη στρέψη στο κέντρο της και γι' αυτό και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως δύο έλικες, με τις ονομασίες α2 (κατάλοιπα 187 έως 194) και α2' (κατάλοιπα 174 έως 185). Η α-έλικα α4 (α4: κατάλοιπα 114 έως 135) είναι ευθεία και προσανατολισμένη σχεδόν παράλληλα στην α-έλικα α5. Η α-έλικα α5 (κατάλοιπα 83 έως 109) συνδέεται με την έλικα α4 μέσω ενός επιμήκους βρόγχου δεκατεσσάρων καταλοίπων (κατάλοιπα 136-149). Η α-έλικα α1 και α2 ενώνονται μεταξύ τους με έναν εξαιρετικά μικρό βρόγχο ενός μόνο καταλοίπου (195). Η α-έλικα α2 και α3 ενώνονται μεταξύ τους με ένα σύνδεσμο οκτώ καταλοίπων (166 έως 173) (Εικόνα 5.15).



Εικόνα 5.15: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς *MmGSTP1-1*. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως A1, A2, A2', A3, A4 και A5 χαρακτηρίζονται οι α-έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της C-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

5.3.7.5 Αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων

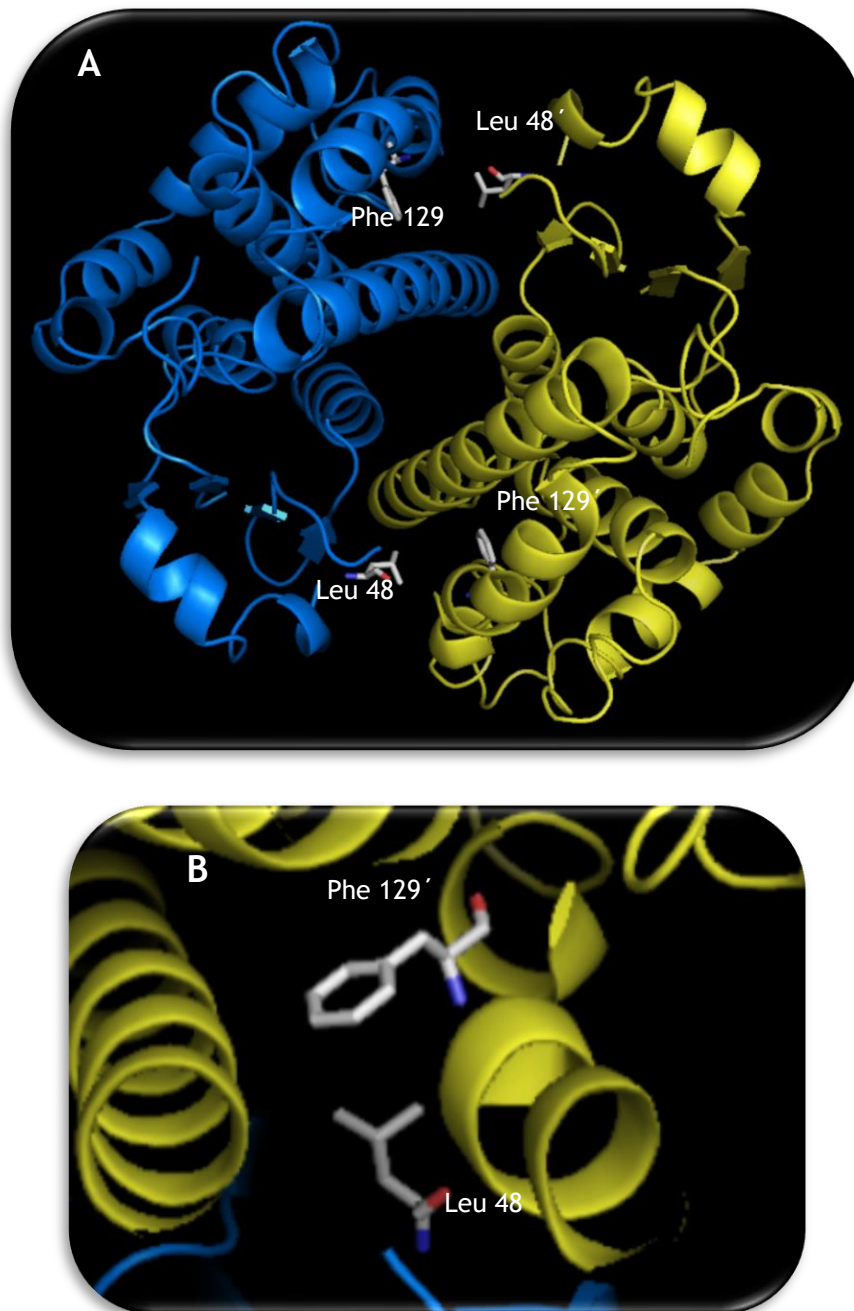
Το διμερές έχει μια ανοικτή διαμόρφωση, με κοινή επιφάνεια αλληλεπιδράσεων των δύο υπομονάδων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας των δύο υπομονάδων είναι τριών τύπων: γέφυρες άλατος, δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου και ενός μοτίβου τύπου 'κλειδαριάς-

κλειδιού' το οποίο και προσδένει φυσικά τις δύο υπομονάδες (Hegazy *et al.*, 2004; Vargo *et al.*, 2004; Ambigairalan *et al.*, 2014; Akiva *et al.*, 2015). Οι γέφυρες άλατος που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρώτης υπομονάδας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5.5).

Πίνακας 5.5: Κυριότερες γέφυρες άλατος μεταξύ των καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου *MmGSTP1-1*. Ως μέγιστο όριο έως του οποίου παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκε η απόσταση 4 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vried, 1990).

Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο)	Απόσταση (Å)	Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο)
15 GLU (OE2)	6.02	7 ARG (NH2)
15 GLU (OE2)	4.00	11 ARG (NE)
15 GLU (OE1)	2.82	18 ARG (NH1)
15 GLU (OE1)	3.83	18 ARG (NH2)
15 GLU (OE1)	4.00	18 ARG (NE)
23 ASP (OD1)	3.91	186 ARG (NH2)
23 ASP (OD1)	3.77	186 ARG (NE)
85 GLU (OE2)	3.81	81 LYS (NZ)
90 ASP (OD2)	3.74	283 ARG (NH1)
90 ASP (OD2)	2.86	283 ARG (NH2)
90 ASP (OD2)	3.99	283 ARG (NE)
94 ASP (OD1)	4.00	70 ARG (NH1)

Στο μοτίβο τύπου 'κλειδιού-κλειδαριάς' του ενζύμου *MmGSTP1-1* η πλευρική αλυσίδα της Leu 48 (Εικόνα 5.16), που βρίσκεται σε ένα βρόγχο της N-τελικής δομικής περιοχής, λειτουργεί ως 'κλειδί' το οποίο εκτείνεται κατά μήκος της κοινής επιφάνειας των υπομονάδων και 'κλειδώνει' μέσα σε μια υδρόφοβη κοιλότητα. Τα κυριότερα αμινοξικά κατάλοιπα αυτής της κοιλότητας είναι τα Val96, Leu99, Tyr103, Val104, Ala121, Pro123, Ley126, Phe129.

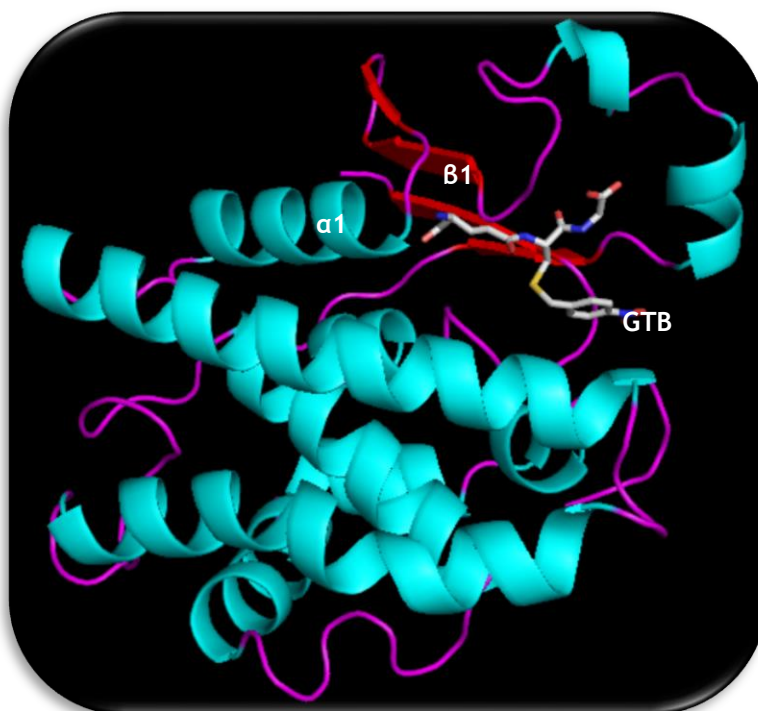


Εικόνα 5.16: Παρουσίαση της δομής του διμερούς *MmGSTP1-1* (A και B). Η υπομονάδα A είναι χρωματισμένη **μπλε** και η υπομονάδα B **κίτρινη**. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που διαμορφώνουν το μοτίβο τύπου ‘κλειδιού-κλειδαριάς’ αναπαρίστανται με ράβδους σύμφωνα με τον ατομικό τους τύπο. Στην Εικόνα B βλέπουμε το μοτίβο ‘κλειδιού-κλειδαριάς’ σε μεγέθυνση. Τα σχήματα παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL. (Delano, 2002).

5.3.7.6 Η περιοχή δέσμευσης της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH (G-θέση)

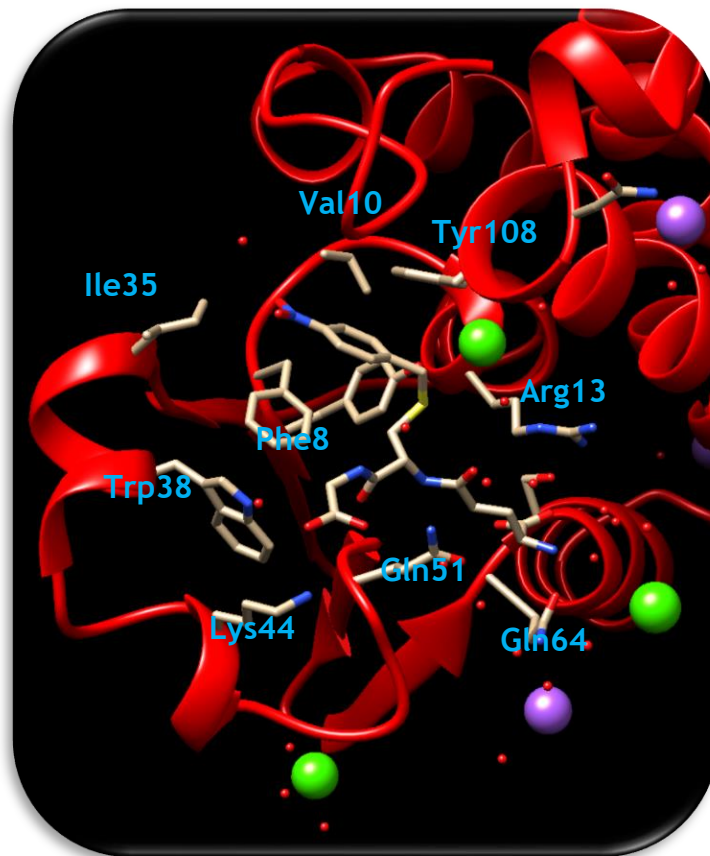
Η G-θέση βρίσκεται στη N-τελική δομική περιοχή και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH, που αποτελεί ανάλογο υποστρώματος. Σε κάθε μονομερές προσδέεται ένα μόριο υποστρώματος. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα σχεδόν σε όλες τις GSTs, όπως και στο *MmGSTP1-1*.

Για την αναγνώριση της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH είναι υπεύθυνο το μοτίβο ββα και αποτελεί την πιο καλά συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλα τα GSTs ένζυμα (Armstrong *et al.*, 1997). Το συγκεκριμένο μοτίβο απαντάται και στις δύο υπομονάδες του ενζύμου *MmGSTP1-1* και είναι προσανατολισμένο προς τα κάτω στην ανεστραμμένη κοιλότητα του ενεργού κέντρου ενώ το γλυκυλο-τμήμα της είναι προσανατολισμένο προς τα πάνω, προβάλλοντας στην περιοχή του διαλύτη (Εικόνα 5.17).



Εικόνα 5.17: Παρουσίαση του συντηρημένου μοτίβου ββα το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH. Η GTB και οι πλευρικές αλυσίδες που βρίσκονται στην στροφή ανάμεσα στο β2-έλασμα και την α-έλικα α1 παίρνουν μέρος στους υδρογονικούς δεσμούς με τα α-άμινο και α-καρβόξυ τμήματα της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH. Τα σχήματα παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL. (Delano, 2002).

Στην εικόνα παρακάτω (Εικόνα 5.18) βλέπουμε τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην αναγνώριση της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αναλυτικότερα, τα αμινοξέα αυτά είναι η Phe8, η Val10 και η Arg13, οι οποίες βρίσκονται στο βρόγχο μεταξύ του β1 ελάσματος και της α-έλικας. Έπειτα, η Ile35, η Trp38 και η Lys44 τοποθετούνται στην α-έλικα μεταξύ του ελάσματος β1 και β3. Ακολουθούν τα κατάλοιπα Gln51 και Gln64, όπου το πρώτο βρίσκεται στο βρόγχο μεταξύ της α-έλικας και του β3 ελάσματος και το δεύτερο μεταξύ του β4 ελάσματος και της α3 α-έλικας.

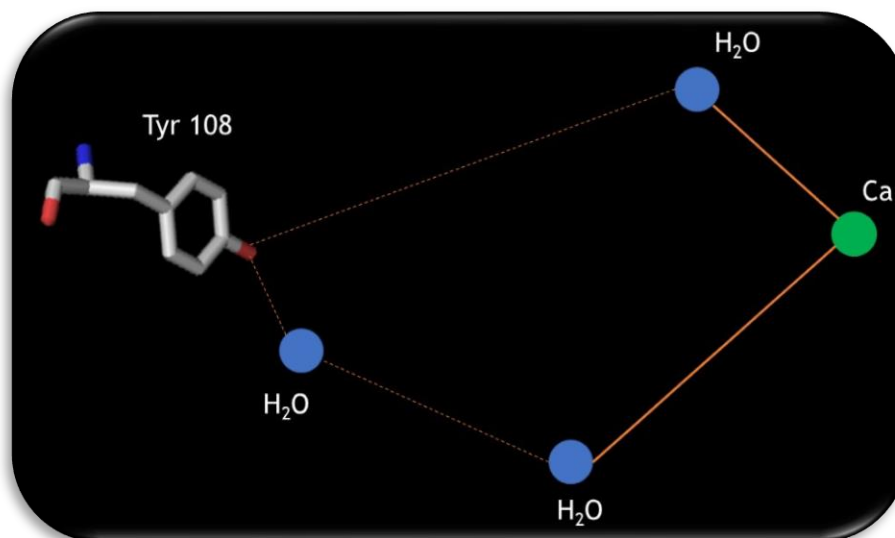


Εικόνα 5.18: Τα αμινοξέα που παίρνουν μέρος στην αναγνώριση της S-(4-νιτροβέλζυλο)-GSH από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα σχήματα παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

5.3.7.7 Το ιόν Ca^{+2} στη δομή του *MmGSTP1-1*

Κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης διατηρήθηκαν στη δομή κάποια ιόντα Ca^{+2} . Έρευνες έχουν δείξει ότι η απαίτηση για ασβέστιο διατηρεί τη δομική ακεραιότητα (Umena *et al.*, 2011).

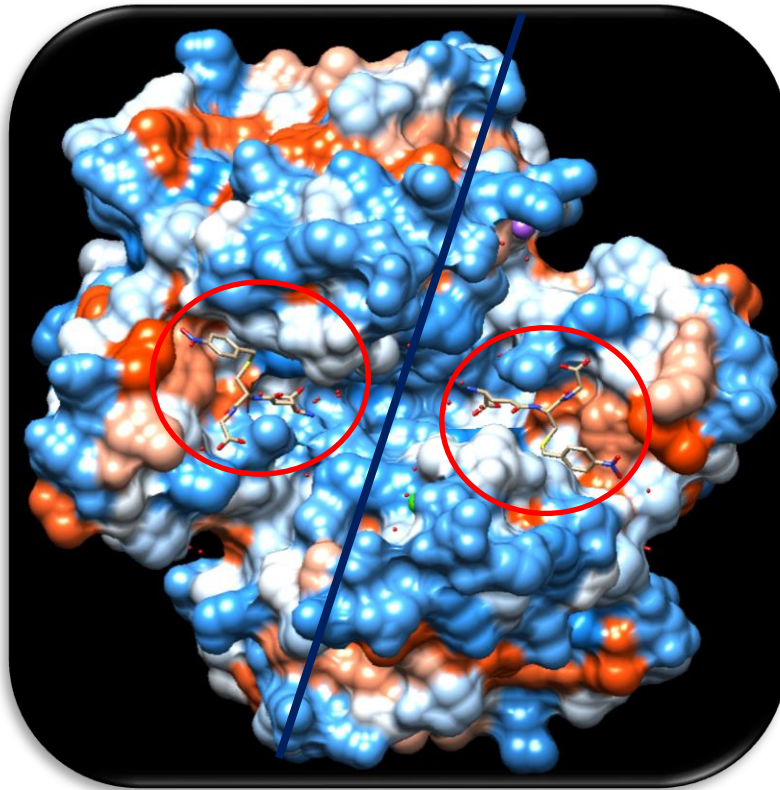
Ανάμεσα στο καταλυτικό αμινοξύ Tyr108 και στο Ca^{+2} δημιουργείται ένα δίκτυο μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η Tyr108 συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με δύο μόρια νερού. Οι δεσμοί αυτοί, είναι μικροί σε μήκος με αποτέλεσμα να είναι και πολύ ισχυροί. Επιπλέον, το ένα μόριο νερού συνδέεται με ένα δεύτερο που βρίσκεται σε μικρή απόσταση, με έναν ακόμα ισχυρό δεσμό υδρογόνου. Τα δύο αυτά μόρια νερού συνδέονται με το ιόν του Ca^{+2} μέσω δεσμών (Σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου γύρω από το κατάλοιπο της Tyr108. Οι δεσμοί μεταξύ των μορίων νερού παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές ενώ οι δεσμοί με το ιόν του Ca^{+2} με συμπαγείς γραμμές.

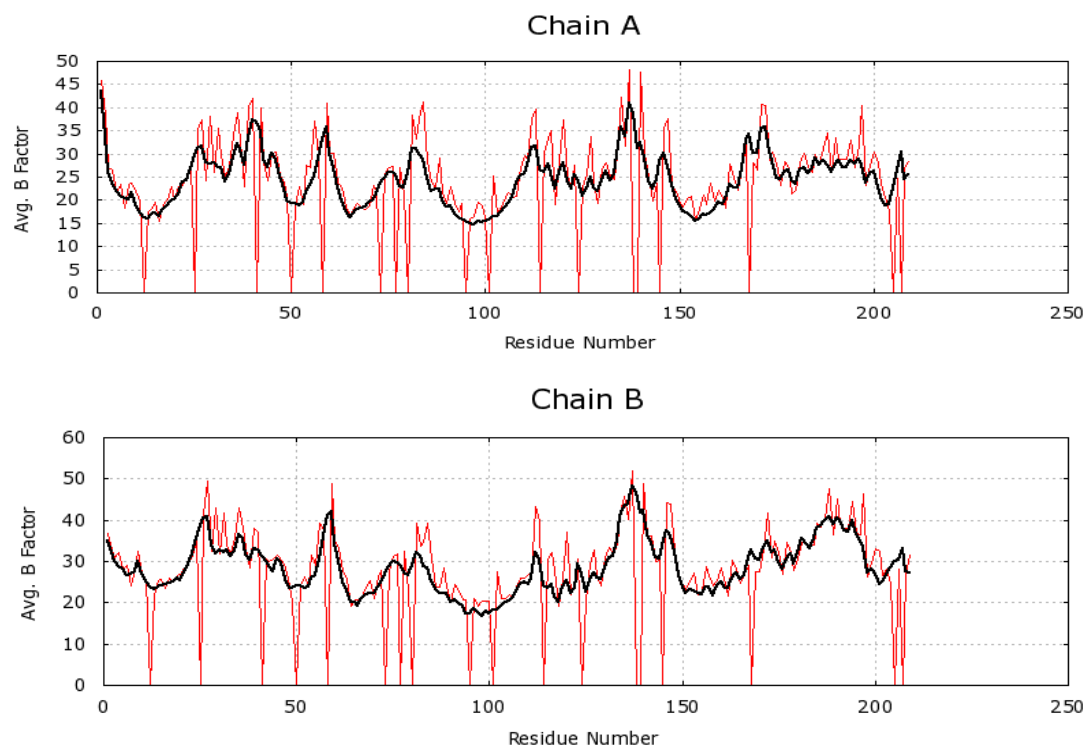
5.3.7.8 Η περιοχή δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων (H-θέση)

Η H-θέση του ενζύμου *MmGSTP1-1* βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και αποτελεί θέση δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Πρόκειται για υδρόφοβη περιοχή με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της να χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Πιο συγκεκριμένα, μερικά υδρόφοβα κατάλοιπα είναι: Ile203, Pro202, Val199, Pro196, Leu192, Leu158, 159, 160, Phe150, Leu132, 133, Pro123, Leu106, Val92, Ala86,87 κ.ά. Όλα αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα είναι τοποθετημένα με κατεύθυνση προς το κέντρο της H-θέσης (Εικόνα 5.19). Τα αμινοξικά κατάλοιπα από τα οποία αποτελείται η H-θέση δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα, γι' αυτό μπορούν να δεσμευτούν μια ποικιλία υποστρωμάτων (Hayes *et al.*, 2005).

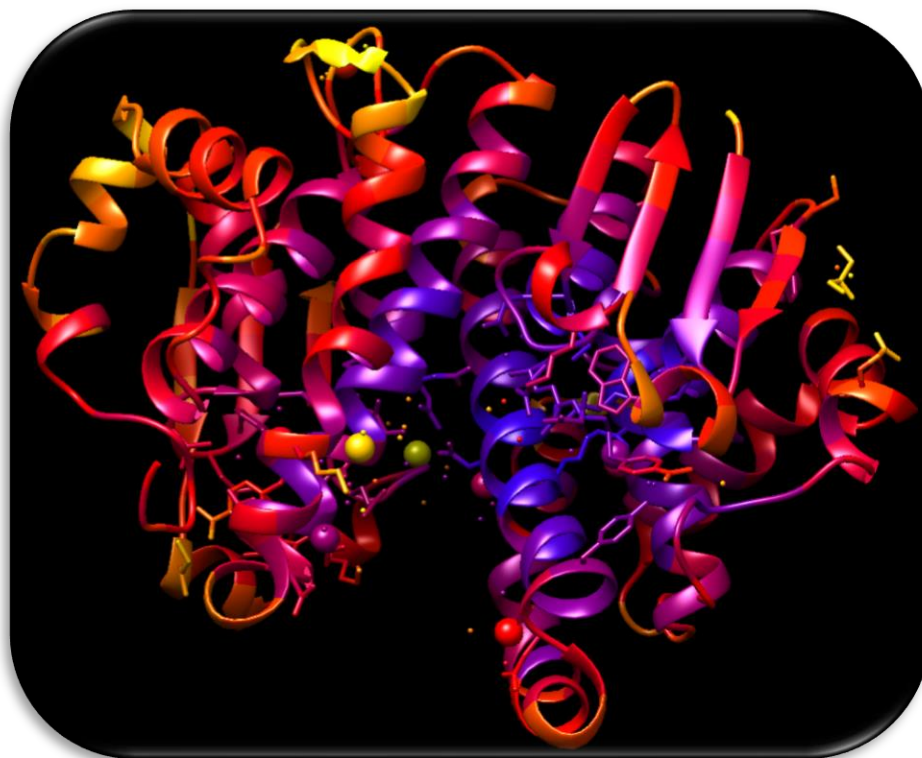


Εικόνα 5.19: Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου *MmGSTP1-1*. Επισημαίνεται η Η-θέση της ενεργής περιοχής στις δύο υπομονάδες του ενζύμου. Η επιφάνεια του μορίου είναι χρωματισμένη σύμφωνα με το ηλεκτροστατικό δυναμικό, τα αρνητικά, θετικά και ουδέτερα φορτία παρουσιάζονται σαν σκιές κόκκινου, μπλε και άσπρου χρώματος, αντίστοιχα. Οι ηλεκτροστατικοί υπολογισμοί και το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της δομής της Η-θέσης είναι η μεγάλη ευλυγισία που παρουσιάζει ο βρόγχος που βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 136 έως 149 καθώς και η α -έλικα $\alpha 4$. Παρατηρούμε τους υψηλούς B-συντελεστές του βρόγχου και της έλικας, που καθαρά υποδεικνύουν τη μεγάλη ευλυγισία των δομικών αυτών στοιχείων (Εικόνα 5.20, 5.21). Η ευλυγισία αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από την ύπαρξη της Gly151 στο τέλος της έλικας. Το ύψος σε κάθε θέση καταλοίπου δείχνει το μέσο B-παράγοντα όλων των ατόμων.



Εικόνα 5.20: Η δυναμική του ενζύμου *MmGSTP1-1*. Η γραφική παράσταση των κρυσταλλογραφικών B-συντελεστών κατά μήκος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των δύο υπομονάδων (A, B) της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου του ενζύμου *MmGSTP1-1*. Με **μαύρο** αναπαρίσταται η κύρια αλυσίδα και με **κόκκινο** η απέναντί της. Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα HPC@NIH.



Εικόνα 5.21: Η δυναμική του ενζύμου *MmGSTP1-1*. Η δομή χρωματίζεται από μπλε (χαμηλός δείκτης b factor), **κόκκινο** (μέτριος δείκτης b factor) έως **κίτρινο** (υψηλός δείκτης b factor) Η γραφική παράσταση κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012).

5.3.8 Βιοϋπολογιστική ανάλυση και προσδιορισμός των σχέσεων δομής-λειτουργίας του ισοενζύμου *MmGSTA1-1*

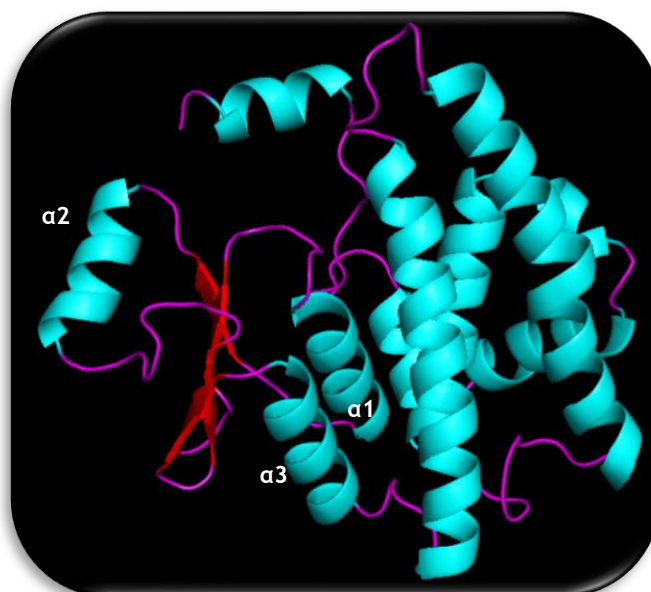
Για να μπορέσουμε να εμβαθύνουμε ακόμα περισσότερο στη δομή του ισοενζύμου GSTA1-1 από *Mus musculus* χρησιμοποιήθηκαν βιοϋπολογιστικές μέθοδοι. Επίσης, προσδιορίσαμε τις σχέσεις δομής και λειτουργίας του ισοενζύμου. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα πρόγραμμα PyMOL και Swiss Model. Η πρόβλεψη της δομής έγινε με εφαρμογή ομόλογης μοντελοποίησης (homology modeling). Η κρυσταλλογραφημένη δομή που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη ανάλυση είναι η 1f3a.1.a με ποσοστό ομοιότητας 96,33 %.

Το διμερές του ισοενζύμου *MmGSTA1-1* αποτελούνται από δύο υπομονάδες, οι οποίες είναι σχεδόν όμοιες και σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 5.22). Ένα χαρακτηριστικό του διμερούς είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό του μορίου, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η μεγάλη οπή που επιτρέπει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στα ενεργά κέντρα του ενζύμου. Κάθε μονομερές αποτελείται από δύο δομικές περιοχές. Τη N-τελική περιοχή με μοτίβο α/β (βαβαββα), από τα κατάλοιπα 6-79 και τη C-τελική περιοχή με μοτίβο τύπου α , από τα κατάλοιπα 86-217.



Εικόνα 5.22: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του ισοενζύμου *MmGSTA1-1*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως κόκκινα βέλη και οι βρόγχοι ως μωβ καλώδια. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

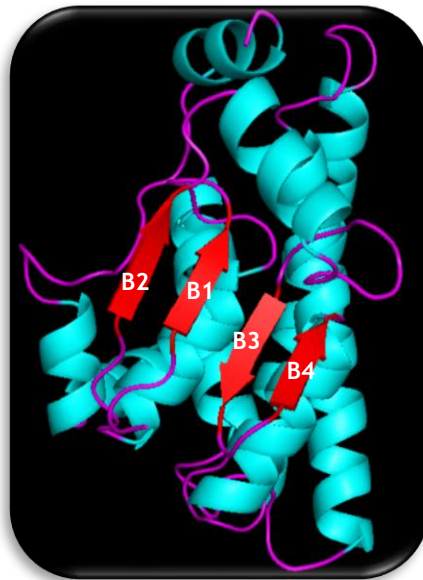
Η N-τελική δομική περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη, αποτελεί περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης και παρέχει τη θέση δέσμευσης της GSH. Αποτελείται από τρεις α-έλικες. Την α1 α-έλικα που αποτελείται από 11 κατάλοιπα, την α2 που αποτελείται από 10 κατάλοιπα και την α3 που αποτελείται από 12 κατάλοιπα (Εικόνα 5.23). Στις α-έλικες, όλες οι ομάδες NH και C=O συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου εκτός από τις πρώτες ομάδες NH και τις τελευταίες ομάδες C=O στα άκρα της έλικας. Συνεπώς, τα άκρα των α-ελίκων είναι πολικά και γι' αυτό βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου.



Εικόνα 5.23: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του ισοενζύμου *MmGSTA1-1*. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β-ελάσματα ως κόκκινα βέλη και οι βρόγχοι ως μωβ καλώδια. Ως α1, α2, και α3 χαρακτηρίζονται οι α-έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Επίσης, η N-τελική δομική τους περιοχή αποτελείται από β-φύλλα δηλαδή από τέσσερα β-ελάσματα και επιδεικνύουν μία δεξιόστροφη κάμψη. Τρία μεσαίου μήκους, τα β1, β2 και β3 και ένα μικρότερου β4. Το έλασμα β3 παρατάσσεται αντιπαράλληλα στα άλλα τρία (β1, β2 και β4). Από τη μία πλευρά, τα β-φύλλα περιβάλλονται από τις δύο α-έλικες α3 και α2, από τις οποίες η α2 είναι τοποθετημένη στην περιοχή που είναι εκτεθειμένη προς το διαλύτη (Εικόνα 5.23). Τα β-ελάσματα στοιχίζονται γειτονικά ο ένας με τον άλλον και συνδυάζονται σε μεικτή β-πτυχωτή επιφάνεια, με ένα ζεύγος β-ελασμάτων (β1-β2) να είναι παράλληλο και δύο αντιπαράλληλα (β1-β3 και β3-β4). Στον παράλληλο συνδυασμό (β1-β2) όλα τα αμινοξέα των β-ελασμάτων έχουν την ίδια

βιοχημική κατεύθυνση, από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο ενώ στην αντιπαράλληλη σύνδεση ($\beta 1-\beta 3$ και $\beta 3-\beta 4$) έχουν αντίθετες κατευθύνσεις, δηλαδή ο ένα έλασμα κατευθύνεται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο και ο επόμενος από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό (Εικόνα 5.24).

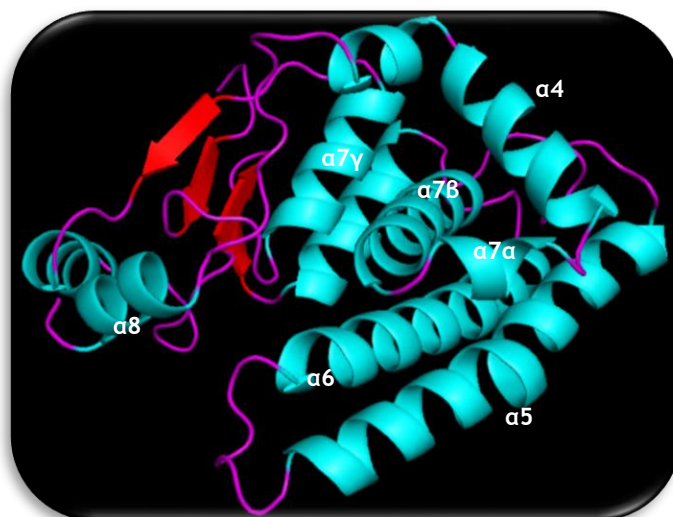


Εικόνα 5.24: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς των *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως μωβ βέλη και οι βρόγχοι ως ροζ καλώδια. Ως $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ και $\beta 4$ χαρακτηρίζονται τα β -ελάσματα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της N-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Οι α -έλικες καθώς κι οι β -πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων. Βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυνητικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενα β -ελάσματα ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και το μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β -φουρκέτας. Το $\beta 1$ -έλασμα συνδέεται με την α -έλικα $\alpha 1$ καθώς και η α -έλικα $\alpha 1$ με τον $\beta 2$ -έλασμα με ένα μικρό βρόγχο μήκους τεσσάρων καταλοίπων ο καθένας. Το $\beta 2$ -έλασμα συνδέεται με την επόμενη α -έλικα ($\alpha 2$) με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο επτά καταλοίπων. Η $\alpha 2$ α -έλικα με τον $\beta 3$ με ένα βρόγχο οκτώ καταλοίπων. Η σύνδεση των κλώνων $\beta 3$ και $\beta 4$ εμφανίζεται με το μοτίβο β -φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, το έλασμα $\beta 4$ ενώνεται με την α -έλικα $\alpha 3$ μόνο με 2 κατάλοιπα (Εικόνα 5.24).

Η C-τελική δομική ενότητα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή και αποτελείται από τα κατάλοιπα 86 έως 217. Αποτελείται από μοτίβο α -

έλικας, με οκτώ α -έλικες διευθετημένες σε αριστερόστροφη περιέλιξη (Εικόνα 5.25). Η δομική αυτή περιοχή παρέχει τα δομικά στοιχεία για την αναγνώριση των ξενοβιοτικών υποστρωμάτων καθώς στη δομική αυτή περιοχή περιλαμβάνεται η Η-θέση. Η α -έλικα α_4 , αποτελούμενη από 25 κατάλοιπα, είναι ευθεία και προσανατολισμένη σχεδόν παράλληλα στην α -έλικα α_6 (15 κατάλοιπα). Η α -έλικα α_7 παρουσιάζει απότομες στρέψεις και στα δύο άκρα της γι' αυτό και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως τρεις έλικες, με τις ονομασίες $\alpha_{7\alpha}$ (αποτελούμενη από 5 κατάλοιπα), $\alpha_{7\beta}$ (αποτελούμενη από 12 κατάλοιπα) και $\alpha_{7\gamma}$ (αποτελούμενη από 7 κατάλοιπα). Η α -έλικα α_6 συνδέεται με την έλικα $\alpha_{7\alpha}$ μέσω ενός βρόγχου μεσαίου μήκους, επτά καταλοίπων. Τέλος, η α -έλικα α_8 αποτελείται οκτώ κατάλοιπα.



Εικόνα 5.25: Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του μονομερούς των *PnGSTU8.1* και *PnGSTU8.2*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως γαλάζιες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως κόκκινα βέλη και οι βρόγχοι ως μωβ καλώδια. Ως α_4 , α_5 , α_6 , $\alpha_{7\alpha}$, $\alpha_{7\beta}$, $\alpha_{7\gamma}$ και α_8 χαρακτηρίζονται οι α -έλικες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της C-τελικής δομικής περιοχής. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

5.4 Συζήτηση

RNA από *Mus musculus* υποβλήθηκε σε κατεργασία με DNase I, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη χρωμοσωμικού DNA. Αφού το RNA μετατράπηκε σε cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την PCR που πραγματοποιήθηκε για να ενισχυθούν τα ισοένζυμα των γονιδίων *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*. Αρχικά, έγινε σύνθεση εκκινητών που να φέρουν κολλώδη άκρα και έπειτα, ακολούθησε PCR για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στον pETite C-His vector και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων. Τα ισοένζυμα *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1* αλληλουχήθηκαν (αποτελούνται από 717 και από 630 βάσεις), καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσροφητή BES-GSH, με αποδόσεις 101 % και 123 % αντίστοιχα και τέλος, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ισοενζύμων καθώς και η καθαρότητα τους κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS. Άλλα ισοένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί από τον ίδιο οργανισμό είναι τα *MmGSTZ1-1* (NP_034493), *MmGSTO1-1* (NP_034492), *MmGSTO2-2* (NP_080895), *MmGSTT1-1* (NP_032211), *MmGSTT2-2* (NP_034491), *MmGSTT3-3* (NP_598755), κ.ά (Andorfer *et al.*, 2004; Mannervik *et al.*, 2005).

Τα ισοένζυμα, πλέον σε καθαρή μορφή, ελέγχθηκαν ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει και άλλη δράση τους όπως για παράδειγμα δράση υπεροξειδάσης (GPx), δράση ισομεράσης ή καταλυτική δράση αναγωγής και θειοτρανσφεράσης (Perperopoulou *et al.*, 2016). Τα ισοένζυμα, *MmGSTA1-1* και *MmGSTP1-1*, παρόλο που καταλύουν περίπου τον ίδιο αριθμό υποστρωμάτων, δεν παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά. Τα *MGSTA1-1* εμφανίζει καταλυτική δράση με όλα τα παράγωγα του νιτροβενζολίου ενώ το *MmGSTP1-1* εκτός από το 4-χλωρο-7νιτροβενζο-2-οξο1,3-διαζόλιο. Υψηλότερη ειδική δραστηριότητα εμφανίζει το FDNB συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Επίσης, τα ισοένζυμα εξετάστηκαν ως προς τη δράση υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας τα υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου, τ-βουτυλουδροϋπεροξείδιο και βενζοϊκό υδροϋπεροξείδιο, ως πιθανά υποστρώματα και φαίνεται να μην εμφανίζουν καταλυτική δράση. Επιπλέον, το flurodifen εμφανίζει μικρή ειδική δραστηριότητα μόνο για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1*. Το αιθακρινικό οξύ φαίνεται να έχει πολύ μικρή καταλυτική δράση για το *MmGSTA1-1* ενώ για το *MmGSTP1-1* είναι αρκετά πιο υψηλή. Ο ισοθειοκυανικός αλληλεστέρας

φαίνεται να αποτελεί υπόστρωμα μόνο για το *MmGSTA1-1* ενώ ο ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλεστέρας παρουσιάζει μέτρια καταλυτική ισχύ και για τα δύο ισοένζυμα, σε σχέση με ο πρότυπο υπόστρωμα, το CDNB.

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση, για τα υποστρώματα GSH και CDNB, η οποία μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και μας δίνει πολλά συμπεράσματα για το μηχανισμό της. Έτσι, υπολογίστηκαν βασικές κινητικές σταθερές (K_m και k_{cat}) και από αυτές πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση διάφορων μεταβολιτών, τη φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και τους *in vivo* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων. Όπως φαίνεται από τις γραφικές παραστάσεις τα ισοένζυμα υπακούουν στην εξίσωση *Michaelis Menten*.

Ειδικότερα, παρατηρούμε πως και τα δύο ισοένζυμα, έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB, φαίνεται να έχουν αρκετά υψηλή K_m , γεγονός που φανερώνει πως δεν εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Chronopoulou *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2016; Perperopoulou *et al.*, 2016; Pouliou *et al.*, 2017). Η σταθερά εξειδίκευσης για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* φαίνεται να είναι αρκετά υψηλή, 213 min^{-1} , σε σχέση με το άλλο ισοένζυμο, περίπου 8-φορές ($26,8 \text{ min}^{-1}$). Όσο αναφορά στη GSH, ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, και τα δύο ισοένζυμα φαίνεται να εμφανίζουν σχετικά μικρή K_m ($0,14 \text{ mM}$ για *MmGSTA1-1* και $0,22 \text{ mM}$ για το *MmGSTP1-1*). Η k_{cat} για το ισοένζυμο *MmGSTA1-1* φαίνεται να είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το *MmGSTP1-1*. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά εξειδίκευσης για το *MmGSTP1-1* είναι περίπου 15-μικρότερη σε σχέση με το άλλο ισοένζυμο. Όμως, όλες οι παραπάνω τιμές κυμαίνονται μέσα στα όρια των κινητικών σταθερών που ακολουθούν οι GSTs (Chronopoulou *et al.*, 2014; Pavlidi *et al.*, 2015; Bartolini *et al.*, 2015; Perperopoulou *et al.*, 2016; Pouliou *et al.*, 2017).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε επίλυση της κρυσταλλοδομής του ισοενζύμου *MmGSTP1-1* σε υψηλή ανάλυση ($1,28 \text{ \AA}$). Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη *MmGSTP1-1* κρυσταλλώνεται ως διμερές αποτελούμενο όπου η κάθε υπομονάδα περιέχει ένα μόριο S-(4-νιτροβέλζυλ)-GSH δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο. Η κρυσταλλική δομή του μονομερούς αποτελείται από 209 αμινοξέα. Οι δύο υπομονάδες του *MmGSTP1-1* σχηματίζουν ένα διμερές με σφαιρικό σχήμα με εμφανές χαρακτηριστικό του διμερούς να είναι το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων στο εσωτερικό του

μορίου, δημιουργώντας έτσι έναν υδρόφοβο πυρήνα και μια υδρόφιλη επιφάνεια. Αν συγκρίνουμε τη δευτεροταγή δομή του ενζύμου *MmGSTP1-1* με ισοένζυμα της ίδιας τάξης από άλλους οργανισμούς παρατηρούμε ότι εμφανίζουν μια εξαιρετική ομολογία μεταξύ τους. Ένα παράδειγμα κρυσταλλοδομής της *pi* τάξης που έχει δημοσιευτεί, με ανάλυση 1,9 Å, είναι αυτή που έχει απομονωθεί από ανθρώπινο οργανισμό (Oakley *et al.*, 1997). Επίσης, έχει κρυσταλλογραφηθεί και το ισοένζυμο GSTT3-3 από *Mus musculus* (Endoh-Yamagami *et al.*, 2010).

Κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης παρατηρήσαμε πως διατηρήθηκαν στη δομή κάποια ιόντα Ca^{+2} . Πιο συγκεκριμένα, ανάμεσα στην Tyr108 και στο Ca^{+2} δημιουργείται ένα δίκτυο μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η Tyr108 συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με δύο μόρια νερού. Οι δεσμοί αυτοί, είναι μικροί σε μήκος με αποτέλεσμα να είναι και πολύ ισχυροί. Επιπλέον, το ένα μόριο νερού συνδέεται με ένα δεύτερο που βρίσκεται σε μικρή απόσταση, με έναν ακόμα πιο ισχυρό δεσμό υδρογόνου. Τα δύο αυτά μόρια νερού συνδέονται με το μόριο του Ca^{+2} . Η υψηλής ανάλυσης κρυσταλλοδομή του *MmGSTP1-1* αποκαλύπτει τη γεωμετρική διάταξη και τον προσανατολισμό του συμπλέγματος $\text{Ca}^{+2}\text{-H}_2\text{O}$.

Κεφάλαιο 6

*Ανάπτυξη ενζυμικού βιοαισθητήρα για
την ανίχνευση του pyrachlostrobin*

6.1 Εισαγωγή

Ο βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιομορίων (Bahadir and Segginturk, 2015, Mehrotra, 2016). Περιλαμβάνουν δύο βασικά στοιχεία: (α) τον (βιο)υποδοχέα, ο οποίος είναι μια ακινητοποιημένη βιολογική ένωση (π.χ. αντιγόνο-αντίσωμα, ενζυμικό υπόστρωμα, συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεϊνικού οξέος) που αλληλεπιδρά με τον αναλυτή στόχο και (β) τον μεταγωγέα ο οποίος μετασχηματίζει την αλληλεπίδραση σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα (Lucarelli *et al.*, 2008, Teles and Fonseca, 2008). Τα τελευταία χρόνια διάφοροι τύποι μεταγωγέων έχουν εξερευνηθεί, όπως οι ηλεκτροχημικοί (αμπερομετρικοί, ποτενσιομετρικοί), οι ηλεκτρικοί, οι οπτικοί και οι θερμικοί (Korotkaya, 2014), κ.ά. Ο πιο συνηθισμένος τύπος μεταγωγέα, ωστόσο, είναι ο ηλεκτροχημικός και ο οπτικός (Cooper and Singleton, 2007, Luong *et al.*, 2008).

Οι βιοαισθητήρες κατατάσσονται ανάλογα με το είδος των βιομορίων αναγνώρισης που χρησιμοποιούν σε:

- α) ενζυμικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι ένζυμο,
- β) ανοσοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι αντίσωμα ή αντιγόνο, αντίστοιχα συζευγμένο με ένζυμο ή χρωστική,
- γ) DNA βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι κάποιο νουκλεϊνικό οξύ,
- δ) κυτταρικούς βιοαισθητήρες/βιοαισθητήρες μικροοργανισμών, όπου το βιολογικό τμήμα μπορεί να είναι κύτταρο-ιστός/μικροοργανισμός και
- ε) βιομημητικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα αποτελούν τεχνητές μεμβράνες, μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή, χημικά και γενετικά τροποποιημένα μόρια.

Ένας από τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους (βιο)υποδοχείς είναι τα ένζυμα. Αυτά είναι εξιδεικευμένα για τον επιθυμητό αναλυτή. Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν τη σύζευξη της ανηγμένης μορφής της GSH σε ένα ευρύ φάσμα ξενοβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των φυτοφαρμάκων όπως το malathion (Kapolli *et al.*, 2008), το atrazine (Andreou and Clonis, 2002), τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Dowd *et al.*, 2010), κ.ά. έχει διερευνηθεί για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων (Chronopoulou and Labrou, 2009, Amine *et al.*, 2016). Η αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα,

η μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα καθώς και η γρήγορη ανταπόκριση των περισσότερων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που εστίασαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση των βιοαισθητήρων. Από τα μειονεκτήματα ξεχωρίζουν το μεγάλο κόστος και η αστάθεια των περισσότερων ενζύμων. (Maia and Nadvorny, 2014; Justino *et al.*, 2015). Είναι γνωστό ότι η απόκριση ενός βιοαισθητήρα στην προσθήκη υποστρώματος προσδιορίζεται από τη συγκέντρωση του προϊόντος (P) της ενζυμικής αντίδρασης που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η αντίδραση ελέγχεται με τον ρυθμό των δύο ταυτόχρονων διεργασιών, δηλαδή την ενζυμική μετατροπή του υποστρώματος (S) και τη διάχυση του προϊόντος από το στρώμα του ενζύμου (Guilbault *et al.*, 2004).

Τα αντισώματα εμφανίζουν, επίσης, μεγάλη επιλεκτικότητα, εξαιρετική ευαισθησία, και δημιουργία ισχυρών δεσμών (Raphael *et al.*, 2015). Η πολύ ισχυρή δέσμευση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα, οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μη αντιστρεπτές, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να είναι συνήθως μίας χρήσης (Auer *et al.*, 2015). Μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές είναι η σήμανση των αντιγόνων με ένζυμα. Τα νουκλεϊνικά οξέα παρουσιάζουν παρόμοια δράση με εκείνη των αντισωμάτων (Lin *et al.*, 2016). Οι DNA βιοαισθητήρες είναι μια κατηγορία αισθητήρων, οι οποίοι αναπτύσσονται βάσει των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μιας αλληλουχίας και των μορίων DNA και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικών ασθενειών και μολύνσεων από ιούς (Abu-Salah *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2017). Η ακινητοποίηση διάφορων μορφών DNA έχει ως σκοπό το χαρακτηρισμό ενώσεων για πιθανή αντικαρκινική ή τοξική δράση τους. Στους βιοαισθητήρες αυτούς μελετώνται φαινόμενα, όπως είναι η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA. Η δέσμευση με το DNA έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων. Τα κύτταρα, οι ιστοί και οι μικροοργανισμοί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βιοαισθητήρων και χαρακτηρίζονται από το σημαντικό πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται να γίνει απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων (Chao *et al.*, 2016).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσίασαν ο Povedano και οι συνεργάτες του οι οποίοι δημιούργησαν έναν ενζυμικό ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων (Povedano *et al.*, 2017). Άλλοι ερευνητές που δημιούργησαν

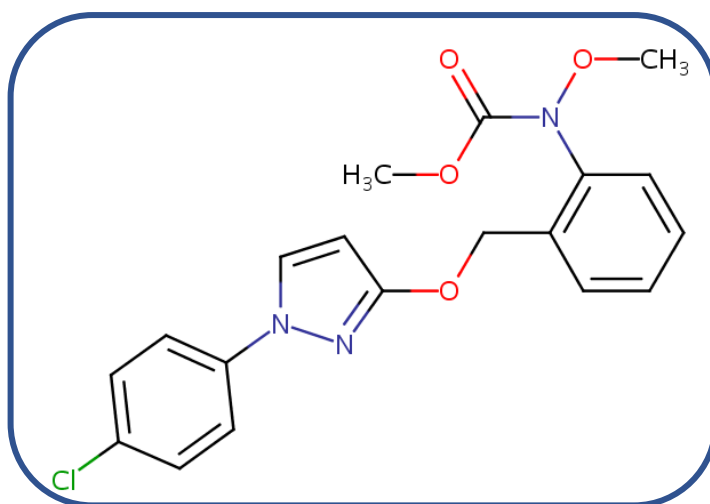
αντίστοιχους βιοαισθητήρες είναι οι Mohiuddin *et al.*, 2016, Lei *et al.*, 2016, Fourou *et al.*, 2016, Okon and Ronkainen., 2017, Moreno *et al.*, 2017, κ.ά.

Άλλο παράδειγμα αποτελεί η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που ενθυλακώθηκε σε κολλοειδές πήκτωμα με γυάλινο καπάκι που θα μπορούσε να στερεωθεί σε μια οπτική ίνα για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων (Doong and Tsai, 2001). Έχουν σχηματιστεί κολλοειδή πήκτωμα χρησιμοποιώντας ενζυμικά διαλύματα αναμειγμένα με διαφορετικούς φθορίζοντες δείκτες. Ο σχεδιασμός τέτοιων βιοαισθητήρων εκμεταλλεύεται την ικανότητα που έχουν να παγιδεύουν μεγάλες ποσότητες ενζύμου και να ενισχύουν τη θερμική και χημική σταθερότητά τους. Οι τεχνικές αυτές προσφέρουν απλότητα παρασκευής χωρίς ομοιοπολική τροποποίηση, ευελιξία στον έλεγχο του μεγέθους του πόρου, τη γεωμετρία και την ελάχιστη απόσβεση των φθορίζοντων αντιδραστηρίων. Με την τεχνική της διασύνδεσης, η γλουταραλδεϋδη αυξάνει σημαντικά την προσκόλληση του ενζύμου στον μεταγωγέα. Ο Colak και οι συνεργάτες του αναφέρουν την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη (Colak *et al.*, 2012).

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που επηρεάζει γενικά τις επιδόσεις του ενζυμικού βιοαισθητήρα είναι το pH. Το pH των διαλυμάτων που περιέχουν υποστρώματα μπορεί να επηρεάσει τη συνολική ενζυμική δραστηριότητα αφού, όπως όλες οι φυσικές πρωτεΐνες, τα ένζυμα έχουν μια φυσική τριτοταγή δομή που είναι ευαίσθητη σε ακραίες τιμές pH. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση του υποστρώματος, η οποία μπορεί να επηρεάσει το βαθμό αναστολής. Ο Kok και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το επίπεδο παρεμπόδισης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος και χρησιμοποίησαν συγκέντρωση κορεσμού στην περίπτωση αναστολής παρασιτοκτόνων (Kok *et al.*, 2002).

To μυκητοκτόνο pyrachlostrobin

Το *pyrachlostrobin* ή αλλιώς [2-[[[1-(4-χλωροφαινυλ)-1H-πυραζολ-3-υλ] οξύ] μεθυλ] φαινυλ] μεθοξυκαρβαμικό οξύ είναι ένα μυκητοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια των στρομπιλουρινών (Εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1: Δομή *pyrachlostrobin*.

Οι στρομπιλουρίνες έχουν καταστεί μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες γεωργικών μυκητοκτόνων. Το ευρύ φάσμα της δράσης τους βασίζεται στην ικανότητά τους να διαταράσσουν τον ενεργειακό κύκλο του μύκητα δεσμεύοντάς τον στο κέντρο οξυγόνωσης της ουμπινοκινόλης του συμπλόκου του κυτοχρώματος bc1 (σύμπλοκο III) στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Bartlett *et al.*, 2002, Herms *et al.*, 2002). Υπάρχουν ενδείξεις ότι, στις συνιστάμενες δόσεις, οι στρομπιλουρίνες μπορούν να επηρεάσουν θετικά την ανάπτυξη των φυτών (Factor *et al.*, 2011; Diaz-Espejo *et al.*, 2012).

Το *pyrachlostrobin* ταξινομείται ως μυκητοκτόνο ευρέος φάσματος που λειτουργεί εναντίον φυτικών παθογόνων που ανήκουν στους τύπους ασκομυκήτων, οωμυκήτων και βασιδιομυκήτων. Η χημική ουσία που περιέχει εμφανίζει ισχυρές εξουδετερωτικές και θεραπευτικές ιδιότητες που προστατεύουν από διάφορες ασθένειες όπως κηλίδες φύλλων και καθαρή κηλίδωση. Το *pyrachlostrobin* εφαρμόζεται συνήθως στις βασικές καλλιέργειες, όπως μπανάνες, κριθάρι, καρότα, μούρα, φιστίκια, αρακάς, κρεμμύδια, τομάτες, καρύδια και σιτάρι. Γενικά, τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για να βελτιωθούν οι αποδόσεις των καλλιεργειών (Kalebich *et al.*, 2017).

Παρενέργειες που επιφέρει το pyrachlostrobin

Το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο έχει αξιολογηθεί ως προς την ικανότητά του να προκαλεί καρκίνο από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA), τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) καθώς και από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH).

Η έκθεση στο *pyrarchlostrobin* μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων οδών, όπως μέσω της αναπνευστικής οδού, του πεπτικού σωλήνα και μέσω άμεσης επαφής με το δέρμα και τα μάτια. Σημειώνεται ότι το μυκητοκτόνο είναι ιδιαίτερα επιβλαβές για τους πνεύμονες και μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό και πόνο στην αναπνευστική οδό. Η κατάποση μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διάφορες πεπτικές διαταραχές, όπως γαστρεντερικές ανωμαλίες, αύξηση βάρους και έλκος στο στομάχι. Επίσης, μια πρόσφατη δημοσίευση από το Υπουργείο Υγείας της Μινεσότα δείχνει ότι η έκθεση στο *pyrarchlostrobin* μπορεί να οδηγήσει σε υπερπλασία και υπερτροφία του βλεννογόνου στο δωδεκαδάκτυλο, αυξημένο βάρος ήπατος και σπλήνα. Μπορεί να είναι επιζήμιο για το κυκλοφορικό σύστημα και να οδηγήσει σε αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Μερικές φορές μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό των βλεννογόνων μεμβρανών, οφθαλμικό πόνο, κνησμό και ερυθρότητα του δέρματος, καθώς και γενική αδυναμία, κεφαλαλγία και ζάλη. Επιπλέον, μια δημοσίευση αποκαλύπτει ότι το *pyrarchlostrobin* έχει βρεθεί ότι μολύνει το υδάτινο οικοσύστημα και επηρεάζει τα ζώα (Willming *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2016).

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

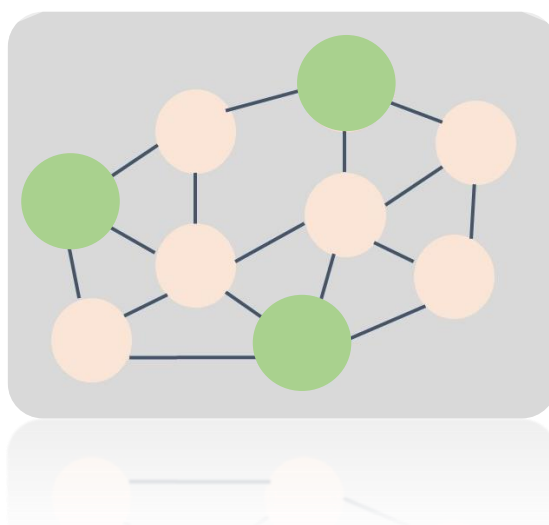
6.2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη ορού (BSA) από την εταιρία Sigma καθώς και γλουταραλδεΰδη, 25 % καθαρότητας, από την εταιρία Merk.

6.2.2 Μέθοδοι

6.2.2.1 Ακίνητοποίηση του μεταλλαγμένου ισοενζύμου shII5 με τη μέθοδο της διασύνδεσης (cross-link)

Για να ακίνητοποιήσουμε το ισοένζυμο shII5 χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της διασύνδεσης (Σχήμα 6.1). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι σχετικά απλή, γεγονός που αποτελεί ένα μεγάλο της πλεονέκτημα. Το βασικό της μειονέκτημα είναι ότι χάνεται ένα σημαντικό ποσοστό της ενζυμικής δραστημότητας του ενζύμου.



Σχήμα 6.1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ενζυμικής ακίνητοποίησης. Με σομόν κύκλους απεικονίζεται το ένζυμο, με πράσινους κύκλους απεικονίζεται η αλβουμίνη ορού και με μπλε γραμμές οι δεσμοί που δημιουργεί η γλουταραλδεΰδη.

Αναλυτικότερα, ελέγχθηκαν οι παρακάτω διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταραλδεΰδης, αλβουμίνης ορού και ενζύμου (Πίνακας 6.1). 0,5 και 1 % (w/v) γλουταραλδεΰδη, 15, 20 και 30 mg αλβουμίνης ορού, 70 και 100 μ L κατάλληλου ενζυμικού παρασκευάσματος.

Πίνακας 6.1: Συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού, γλουταραλδεΐδης και ενζύμου που ελέγχθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου.

A/A	Γλουταραλδεΐδη (%)	Αλβουμίνη ορού (mg)	Ένζυμο (μL)
1	0,5	15	100
2	0,5	15	70
3	0,5	20	100
4	0,5	20	70
5	0,5	30	100
6	0,5	30	70
7	1	15	100
8	1	15	70
9	1	20	100
10	1	20	70
11	1	30	100
12	1	30	70

Πιο συγκεκριμένα, σε κυψελίδες του ενός και των τεσσάρων mL δοκιμάστηκαν οι παραπάνω συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 200 και 250 μL, αντίστοιχα. Μέχρι την πλήρωση του συγκεκριμένου όγκου προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM KH₂PO₄, pH 7. Αρχικά, προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα και την αλβουμίνη, έπειτα τη γλουταραλδεΐδη και τέλος το ένζυμο. Καλύπτεται η κυψελίδα και κατόπιν, τοποθετείται στους 4 °C για 24 h. Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα, φυλάσσεται σε διάλυμα 100 mM KH₂PO₄, pH 6,5 στους 4 °C.

6.2.2.2 Κινητική μελέτη ακινητοποιημένου ενζύμου για το σύστημα CDNB/GSH

Κινητική μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου shII5 (§2.2.35), έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν το ακινητοποιημένο ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M pH 6,5 GSH σε σταθερή συγκέντρωση και CDNB μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το

εύρος τιμών 280-3.000 μM για το shII5. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 2 s και για συνολικό χρόνο 1200 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7.

Κινητική μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου shII5 (§2.2.35), έχοντας τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Οι αρχικές ταχύτητες με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υπολογίστηκαν στους 37 °C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν το ακινητοποιημένο ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 0,1 M pH 6,5 CDNB σε σταθερή συγκέντρωση και GSH μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης που καλύπτει το εύρος τιμών 375-5.250 μM για το shII5. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 340 nm, ανά 2 s και για συνολικό χρόνο 1200 s. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7.

6.2.2.3 Προσδιορισμός τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) του ακινητοποιημένου ενζύμου

Ο προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος του ακινητοποιημένου ενζύμου, δηλαδή ο υπολογισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης του αναστολέα, η οποία είναι ικανή να προσδώσει αναστολή 50 % (IC_{50}) σε ένα ακινητοποιημένο ένζυμο, αναφέρεται αναλυτικά στην § 2.2.36. και πραγματοποιήθηκε με το σύστημα CDNB/GSH. Για τον μάρτυρα σε κάθε συγκέντρωση ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς την παρουσία ενζύμου στο πύκτωμα.

6.2.2.4 Μελέτη της σταθερότητας της ακινητοποίησης σε σχέση με το χρόνο

Μελετήθηκε η δομική σταθερότητα, δηλαδή η εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με το χρόνο σε σταθερή θερμοκρασία. Το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο παρέμειναν για χρονικό διάστημα t σε καθορισμένη σταθερή θερμοκρασία, στους 4 °C. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλους χρόνους

με ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4), συγκέντρωσης 0,1 M, pH 6,5 χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH (§ 2.2.15). Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν και επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraphPad Prism 7.

6.2.2.5 Ανίχνευση του *pyrachlostrobin* σε δείγματα νερού με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε

Για τον προσδιορισμό του *pyrachlostrobin* σε δείγματα νερού δημιουργήθηκαν δύο πρότυπες. Μία για το νερό δικτύου και μία για το εμπορικό μεταλλικό νερό Anra, στα οποία είχαν προστεθεί γνωστές ποσότητες *pyrachlostrobin* σε συγκεντρώσεις 0-60 μM . Η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 340 nm, με το σύστημα GSH/CDNB, σε ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού οξέος 0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5.

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Ακίνητοποίηση του μεταλλαγμένου ισοενζύμου shPI5 με τη μέθοδο της διασύνδεσης (cross-link)

Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης, αλβουμίνης ορού (BSA) και ενζύμου που ελέγχθηκαν όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 6.1. Ειδικότερα, παρατηρούμε πως παραπάνω από μία συνθήκες ακίνητοποίησης εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα με το σύστημα GSH/CDNB (§ 2.2.15). Οι υπόλοιπες συνθήκες είτε δεν εμφάνισαν ενζυμική δραστικότητα είτε δεν εμφάνισαν πήκτωμα. Με κόκκινο δείχνει εκείνη η συνθήκη η οποία εμφάνισε την υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα. Αυτή είναι 0,5 % v/v γλουταραλδεΐδη, 20 mg BSA και 100 μ L κατάλληλου ενζυμικού παρασκευάσματος.

Πίνακας 6.2: Συγκεντρωτικός Πίνακας αποτελεσμάτων ακίνητοποίησης.

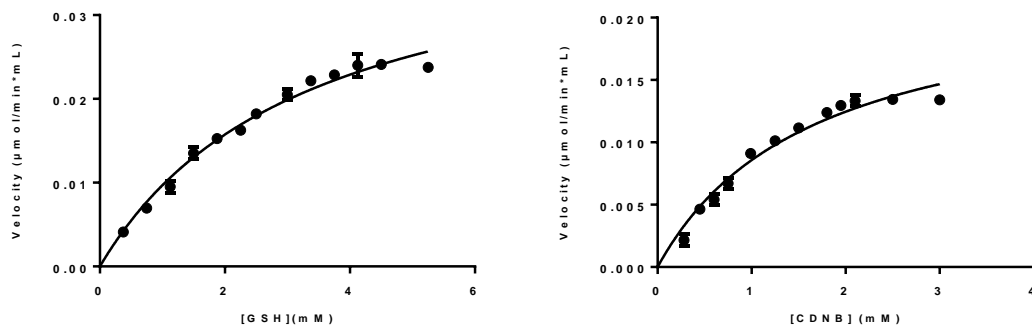
A/A	Ενζυμική δραστικότητα ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	
	Κυψελίδες των 2 mL	Κυψελίδες των 4 mL
1	0	0
2	0	0,006
3	0,022	0,001
4	0,01	0
5	0	0,005
6	0	0
7	0,009	0
8	0	0,0023
9	0	0,004
10	0,008	0
11	0	0
12	0,009	0,007

6.3.2 Κινητική ανάλυση του ακίνητοποιημένου ενζύμου για το σύστημα GSH/CDNB

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για το σύστημα CDNB/GSH και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι, K_m και k_{cat} (Πίνακας 6.3). Το

ακίνητοποιημένο ισοένζυμο υπακούει στην εξίσωση κινητικής των *Michaelis Menten* και ως προς τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 6.2).

Ειδικότερα, η K_m και ως προς τα δύο υποστρώματα φαίνεται να είναι πολύ αυξημένη σε σχέση με το ελεύθερο ισοένζυμο. Πιο συγκεκριμένα, η K_m έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH στο ελεύθερο ισοένζυμο είναι 0,5 mM ενώ στο ακίνητοποιημένο φαίνεται να είναι 7-φορές μεγαλύτερη, 3,3 mM. Όσον αναφορά στο CDNB, το ελεύθερο ισοένζυμο εμφανίζει τιμή K_m 0,4 mM ενώ το ακίνητοποιημένο 1,7 mM, δηλαδή 4,5-φορές μεγαλύτερη.



Εικόνα 6.2: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος για το ισοένζυμο shII5.

Πίνακας 6.3: Κινητική ανάλυση για το ακίνητοποιημένο ισοένζυμο shII5 με το σύστημα CDNB/GSH.

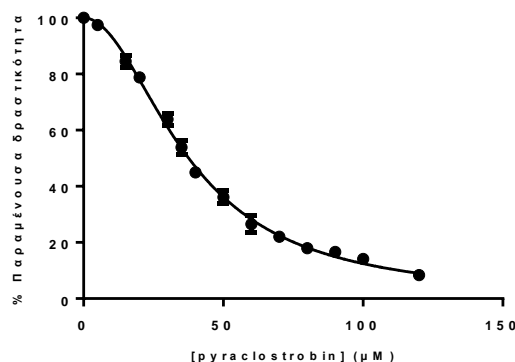
ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	CDNB	GSH
	shII5	
K_m (mM)	$1,7 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,3$
k_{cat} (min^{-1})	$3.914,6 \pm 264,2$	$2.937,5 \pm 211,2$

6.3.3 Προσδιορισμός της τιμής ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) του *pyrachlostrobin* για το ακίνητοποιημένο ισοένζυμο

Προσδιορίστηκε η τιμή της ανασταλτικής της ισχύος του *pyrachlostrobin* για το ακίνητοποιημένο ένζυμο. Για τον υπολογισμό του IC_{50} πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην § 2.2.15. Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του *pyrachlostrobin*, κατά την οποία η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου είναι ίση με το 50 % της αρχικής της τιμής (Πίνακας 6.4). Το *pyrachlostrobin* μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

ως προς την αναστολή που επιφέρει στην ενζυμική δραστηριότητα σε σταθερή ποσότητα ισοενζύμου shII5 και υπολογίστηκε κάθε φορά η παραμένουσα δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου (Εικόνα 6.3). Ως 100 % θεωρείται η παραμένουσα δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

Το ακινητοποιημένο ισοένζυμο shII5 φαίνεται να έχει πολύ μεγαλύτερο IC₅₀ σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, περίπου τρεις φορές παραπάνω.



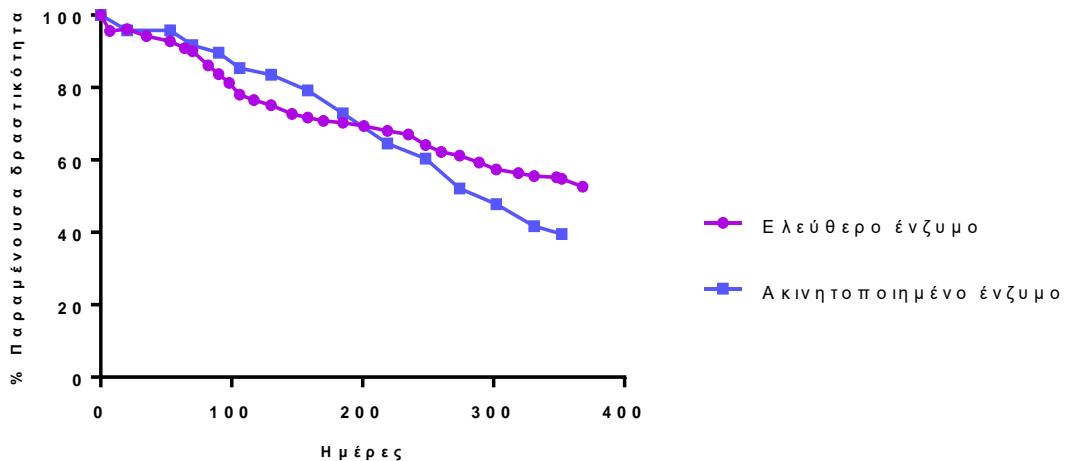
Εικόνα 6.3: Καμπύλες παραμένουσας δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ισοενζύμου shII5 (%) για το *pyrachlostrobin* όπου τα σημεία αντιστοιχούν σε 13 διαφορετικές συγκεντρώσεις (5-120 μM).

Πίνακας 6.4: Τιμή ανασταλτικής ισχύος (IC₅₀) του *pyrachlostrobin* για το ακινητοποιημένο ισοένζυμο shII5.

Ένζυμο	IC ₅₀ (μM)
<i>pyrachlostrobin</i>	37,4 ± 0,4

6.3.4 Δομική σταθερότητα του ισοενζύμου shII5 για το ακινητοποιημένο ισοένζυμο σε σχέση με το χρόνο

Μελετήθηκε η δομική σταθερότητα του ισοενζύμου shII5, τόσο στο ελεύθερο ισοένζυμο όσο και στο ακινητοποιημένο. Σύμφωνα με την Εικόνα 6.4, φαίνεται ότι το ακινητοποιημένο ισοένζυμο παρουσιάζει υψηλότερη δομική σταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο, όσο αγορά στις πρώτες 200 ημέρες. Έπειτα, η παραμένουσα δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ισοενζύμου είναι πιο χαμηλή σε σχέση με το ελεύθερο ισοένζυμο.



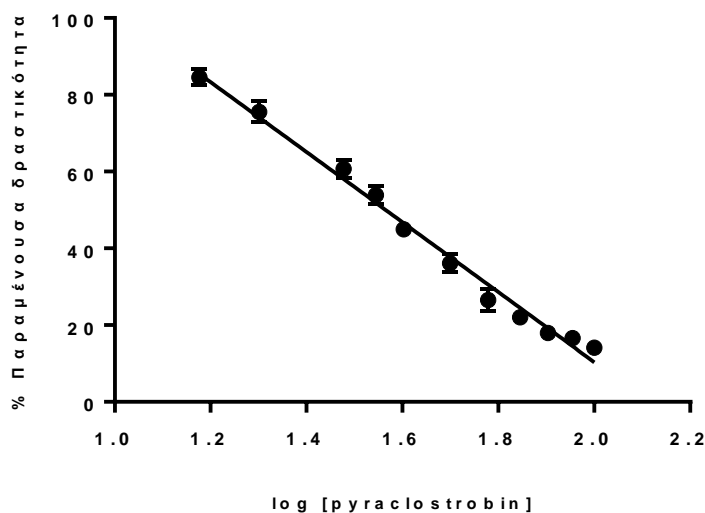
Εικόνα 6.4: Απεικόνιση της δομικής σταθερότητας στους 4 °C για το ελεύθερο ισοένζυμο και για το ακίνητοποιημένο.

6.3.5 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βασιζόμενη στην εκλεκτικότητα και στη δράση του ακίνητοποιημένου ισοενζύμου

Στην Εικόνα 6.5 φαίνονται τα αποτελέσματα των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων του ακίνητοποιημένου ισοενζύμου για διαφορετικές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin*, σε ένα εύρος τιμών από 15 μέχρι 100 μM . Η σχέση μεταξύ της αλλαγής της συγκέντρωσης του *pyrachlostrobin* και της παραμένουσας ενζυμικής δραστητικότητας φαίνεται να είναι γραμμική, για το συγκεκριμένο εύρος τιμών, με $R^2 = 99,5 \%$.

Η γραμμική σχέση είναι η εξής:

$$Y = -91,23 \cdot X + 192,8$$

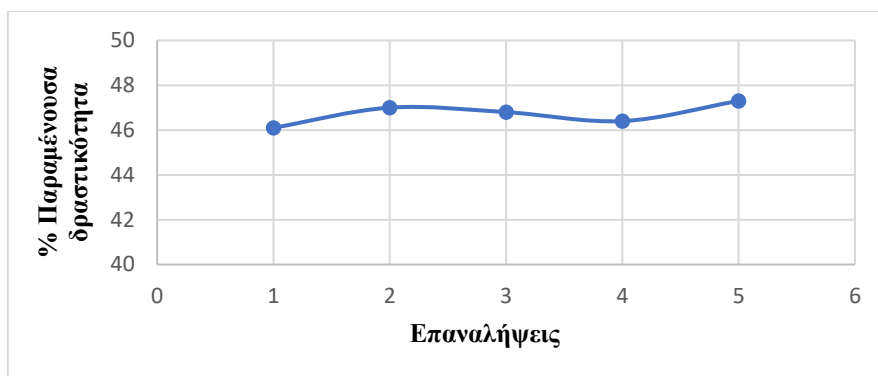


Εικόνα 6.5: Πρότυπη καμπύλη για διαφορετικές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin* με το ακινητοποιημένο ισόενζυμο shII5. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον δύο επαναλήψεων με τυπική απόκλιση μικρότερη του 5 %.

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου καθώς και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων επιλέχθηκε τυχαία μια συγκέντρωση *pyrachlostrobin*, 42 μM και πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 6.5). Πιο συγκεκριμένα, το εύρος των επαναλήψεων κυμάνθηκε από 46,1 έως 47,3 % με μέση τιμή το $46,7 \pm 0,6$ % (Εικόνα 6.6).

Πίνακας 6.5: Παραμένουσα δραστηριότητα με σταθερή συγκέντρωση *pyrachlostrobin* (42 μM) για το ακινητοποιημένο ισόενζυμο shII5.

Επαναλήψεις				
1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	4 ^η μέτρηση	5 ^η μέτρηση
46,1	47,0	46,8	46,4	47,3



Εικόνα 6.6: Απεικόνιση της διασποράς των επαναλήψεων του ακινητοποιημένου ισοενζύμου shII5 με σταθερή συγκέντρωση *pyrachlostrobin*.

6.3.6 Προσδιορισμός του *pyrachlostrobin* σε δείγματα νερού με την μέθοδο που αναπτύχθηκε

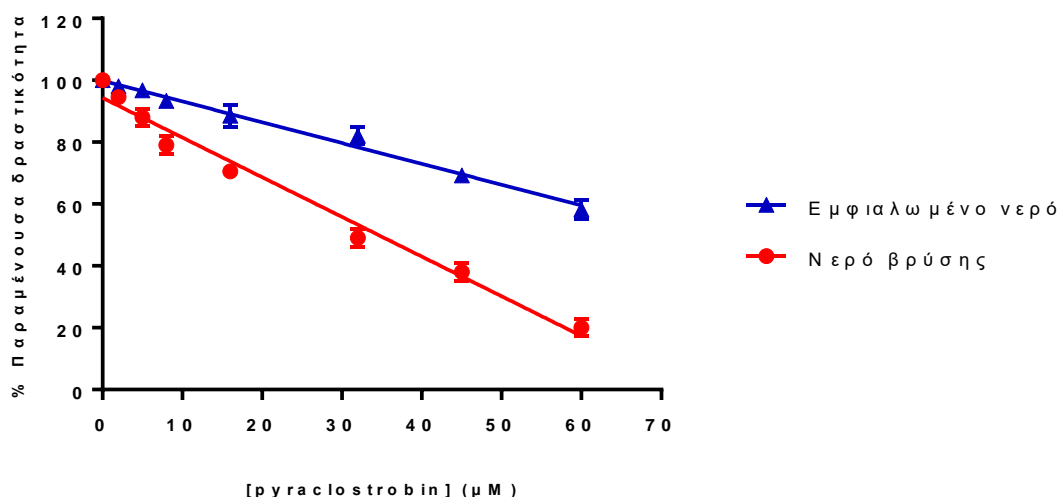
Το ισοένζυμο shII5 χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα, με τη μέθοδο της διασύνδεσης, για τον προσδιορισμό του *pyrachlostrobin* σε υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα. Η ευαισθησία, της συγκεκριμένης μεθόδου, βασίζεται στην ικανότητα που εμφανίζει το *pyrachlostrobin* να αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα του shII5.

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της § 6.3.5 η συγκέντρωση του *pyrachlostrobin* συσχετίζεται γραμμικά με την παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα του shII5. Στην Εικόνα 6.7 φαίνονται οι πρότυπες καμπύλες που δημιουργήθηκαν για το *pyrachlostrobin* σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού Anva καθώς και σε νερό δικτύου. Φαίνεται πως η αναστολή του ενζύμου να εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του *pyrachlostrobin* στα δείγματα νερού, σε ένα εύρος τιμών από 2 έως 60 μM . Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι γραμμικής εξάρτησης. Ειδικότερα, η εξίσωση που προέκυψε για το εμφιαλωμένο νερό είναι η ακόλουθη:

$$Y = -0,6728 \cdot X + 99,88, R^2 = 0,99$$

Ενώ για το νερό βρύσης είναι η εξής:

$$Y = -1,283 \cdot X + 94,32, R^2 = 0,98$$



Εικόνα 6.7: Πρότυπες καμπύλες για το *pyrachlostrobin* σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού και νερού βρύσης με το ακινητοποιημένο ένζυμο shP5.

Η εφαρμογή και η επαναληψιμότητα της μεθόδου μελετήθηκε και με πειράματα ανάκτησης, χρησιμοποιώντας δείγματα νερού βρύσης και εμφιαλωμένου νερού, επιβαρυσμένα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις του *pyrachlostrobin*. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα από τα δυο πειράματα ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν.

Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση για τα δείγματα εμφιαλωμένου νερού και *pyrachlostrobin* κυμάνθηκε από 97,8-101,4 % με μέση τιμή $98,7 \pm 2,7$ % (N=5) (Πίνακας 6.6) και για το νερό δικτύου 97,9-101,2 % με μέση τιμή $99,1 \pm 2,1$ % (N=5) (Πίνακας 6.7).

Πίνακας 6.6: Τιμές ανάκτησης δειγμάτων εμφιαλωμένου νερού Αντα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin*.

μM	% Παραμένουσα δραστηριότητα		% Διαφορά
	Αναμενόμενα	Ευρεθέντα	
5	88,0	86,2	97,9
10	80,2	81,3	101,4
15	72,5	74,1	97,8
30	53,1	51,9	98,0
50	37,8	37,1	98,2

Πίνακας 6.7: Τιμές ανάκτησης δειγμάτων πόσιμου νερού δικτύου με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin*.

μM	% Παραμένουσα δραστικότητα		% Διαφορά
	Αναμενόμενα	Ευρεθέντα	
5	96,7	97,9	101,2
10	91,6	90,6	98,9
15	87,3	86,3	98,8
30	80,6	79,0	98,0
50	64,4	63,5	98,6

6.4 Συζήτηση

Εξαιτίας των σημερινών περιβαλλοντικών συνθηκών και του τρόπου ζωής υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για περισσότερο εύχρηστες, σταθερές, γρήγορες και σχετικά οικονομικές τεχνολογίες. Οι τεχνολογίες αυτές θα διευκόλυναν την επιτόπια ανάλυση δειγμάτων ('on-site' ανάλυση), με αποτέλεσμα τον περιορισμό του αριθμού αυτών που θα αποστέλλονταν για περαιτέρω ανάλυση στο εργαστήριο. Συνεπώς, υπάρχει σαφής ανάγκη για απλούστερα, εναλλακτικά συστήματα ανάλυσης που επιτρέπουν την καταγραφή αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο (real-time) και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι βιοαισθητήρες (Teles and Fonseca, 2008). Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις, οι οποίες αξιοποιούν είτε ένα βιολογικό υλικό (βιοσυστατικό) είτε ένα υλικό 'βιομιμητή' ως μόριο αναγνώρισης το οποίο είτε συνδέεται είτε ενσωματώνεται σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος. Ο συνήθης στόχος είναι η παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προς ανάλυση στοιχείου (Korotkaya, 2014).

Σε αυτό το κεφάλαιο, αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας ανίχνευσης του *pyrachlostrobin* σε υδάτινα περιβαλλοντικά δείγματα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή της διασύνδεσης (cross link) και ως δεσμός χρησιμοποιήθηκε η γλουταραλδεϋδη. Η μέθοδος είναι σχετικά απλή αλλά χάνεται υψηλό ποσοστό της ενζυμικής δραστηριότητας (Singh *et al.*, 2009; Colak *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για το σύστημα GSH/CDNB, όπου βρέθηκε να υπακούει στην εξίσωση κινητικής των *Michaelis Menten* και ως προς τα δύο υποστρώματα. Η τιμή της K_m και ως προς τα δύο υποστρώματα φαίνεται να είναι πολύ αυξημένη σε σχέση με το ελεύθερο ισοένζυμο. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της K_m έχοντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH στο ελεύθερο ισοένζυμο είναι 0,5 mM ενώ στο ακινητοποιημένο φαίνεται να είναι περίπου 7-φορές μεγαλύτερη. Όσον αναφορά στο CDNB, το ελεύθερο ισοένζυμο εμφανίζει K_m 0,4 mM ενώ το ακινητοποιημένο 1,7 mM, δηλαδή 4,5-φορές μεγαλύτερη τιμή. Επίσης, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) για το *pyrachlostrobin* με το ακινητοποιημένο ισοένζυμο. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του *pyrachlostrobin* κατά την οποία έχουμε παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα ίση με το 50 % της αρχικής της τιμής. Το ακινητοποιημένο ισοένζυμο shII5 φαίνεται να

έχει 3-φορές μεγαλύτερη τιμή IC_{50} σε σχέση με το ελεύθερο. Το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο τις περισσότερες φορές εμφανίζουν παρόμοια κινητική συμπεριφορά. Όμως ανάλογα με τη μέθοδο ακινητοποίησης και το ένζυμο μπορεί να αλλάξει η σταθερά *Michaelis* (K_m), η σταθερά αναστολής (K_i), η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}), η σταθερά εξειδίκευσης (k_{cat}) της ενζυμικής αντίδρασης και η τιμή ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) (Pierre, 2004). Τα περισσότερα ακινητοποιημένα ισοένζυμα παρουσιάζουν αύξηση της τιμής της K_m σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (DeLisa *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διάχυση των υποστρωμάτων μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος και πηκτώματος (Apreti *et al.*, 2011).

Η ευαισθησία, της μεθόδου που αναπτύχθηκε, βασίζεται στην ικανότητα που έχει το *pyrachlostrobin* να αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα του shII5. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ακινητοποιημένου ενζύμου για διαφορετικές συγκεντρώσεις *pyrachlostrobin*, σε ένα εύρος τιμών από 15 - 100 μM , έδειξαν ότι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού και της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας φαίνεται να είναι γραμμική, για το συγκεκριμένο εύρος τιμών, με $R^2 = 99,5 \%$. Η εξίσωση που την περιγράφει είναι η εξής: $Y = -91,23 * X + 192,8$. Για τον προσδιορισμό του *pyrachlostrobin* δεν χρειάστηκε επώαση, καθώς η αναστολή που επέφερε στο shII5 ήταν άμεση. Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου καθώς και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων επιλέχθηκε τυχαία μια συγκεκριμένη συγκέντρωση *pyrachlostrobin*, τα 42 μM . Πιο συγκεκριμένα, το εύρος των επαναλήψεων κυμάνθηκε από 46,1 έως 47,3 % με μέση τιμή το $46,7 \pm 0,6 \%$ ($N=5$). Έχουν υπάρξει στο παρελθόν τέτοιου είδους βιοαισθητήρες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Enayati και οι συνεργάτες της οι οποίοι χρησιμοποίησαν την τρανσφεράση της γλουταθειόνης GST1-6 από ένα είδος κουνουπιού, *Anopheles gambiae*, για να ανιχνεύσουν πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Enayati *et al.*, 2001). Άλλο παράδειγμα αποτελεί ο Dowd και οι συνεργάτες του που απομόνωσαν μια GST από το φυτό χρένο και την ακινητοποίησαν πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο (Down *et al.*, 2009).

Επιπλέον, δημιουργήθηκαν πρότυπες για το *pyrachlostrobin* σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού καθώς και σε νερό δικτύου. Φαίνεται ότι η αναστολή του ενζύμου εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του *pyrachlostrobin* στα δείγματα νερού, σε ένα εύρος τιμών από 2 έως 60 μM . Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι γραμμικής

εξάρτησης. Αναλυτικότερα, η εξίσωση που προέκυψε για το εμφιαλωμένο νερό είναι η $Y = -0,6728 \cdot X + 99,88$, $R^2 = 0,99$, ενώ για το νερό βρύσης είναι η $Y = -1,283 \cdot X + 94,32$, $R^2 = 0,98$. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου μελετήθηκε και με πειράματα ανάκτησης, χρησιμοποιώντας δείγματα νερού βρύσης καθώς και εμφιαλωμένου νερού, επιβαρυνμένα με ήδη γνωστές συγκεντρώσεις του *pyrachlostrobin*. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση για τα δείγματα εμφιαλωμένου νερού και *pyrachlostrobin* κυμάνθηκε από 97,8-101,4 % με μέση τιμή $98,6 \pm 2,7$ % και για το νερό δικτύου 98,0-101,2 % με μέση τιμή $99,1 \pm 2,1$ %.

Αρκετοί βιοαισθητήρες οι οποίοι έχουν δημιουργηθεί με τη μέθοδο της διασύνδεσης (cross link) έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία χρόνια. Οι βιοαισθητήρες αυτοί συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ξеноβιοτικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δημιουργία ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του molinate σε υδάτινα περιβαλλοντικά δείγματα (Oliveira *et al.*, 2013). Για την ακινητοποίηση του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασύνδεσης. Επίσης, ο Reardor και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα με τη μέθοδο της διασύνδεσης για να ανιχνεύουν οργανικές ενώσεις σε δείγματα από χόμα ή νερό (Reardor *et al.*, 2016). Ένας άλλος πολλά υποσχόμενος βιοαισθητήρας είναι αυτός που δημοσιεύτηκε από τον Samanman και τους συνεργάτες του, όπου ακινητοποίησαν την GST πάνω σε ηλεκτρόδιο χρυσού για την ανίχνευση του ιού της 'λευκής κηλίδας' σε υδατοκαλλιέργειες. Η αποτελεσματικότητά του ήταν κάτι παραπάνω από εξαιρετική καθώς μπορούσε να ανιχνεύσει ακόμα και ένα μόνο αντίγραφο του ιού στα προς ανάλυση δείγματα (Samanman *et al.*, 2011). Ο Warner και οι συνεργάτες του δημιούργησαν έναν βιοαισθητήρα βασισμένο στην ακετυλοχολυνεστεράση, με τη μέθοδο της διασύνδεσης για να ανιχνεύουν φυτοφάρμακα (Wang *et al.*, 2016). Ο Akyilmaz και η ομάδα του δημοσίευσαν έναν βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων (Akyilmaz *et al.*, 2017). Ο Filip και οι συνεργάτες του ακινητοποίησαν την κονκαναβαλίνη A, μια λεκτίνη, με τη μέθοδο της διασύνδεσης, χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη, για να κατασκευάσουν έναν βιοαισθητήρα. Τα παραπάνω επιτυχημένα αποτελέσματα παρέχουν το έναυσμα για την ανάπτυξη μικροσκοπικών και φθηνών βιοαισθητήρων βασισμένων σε λεκτίνες για χρήση στη διάγνωση ασθενειών (Filip *et al.*, 2017). Επίσης, ο Chaichi και ο Alijanpour δημιούργησαν έναν βιοαισθητήρα με νανοσωματίδια από κράμα Au/Ag για τον

προσδιορισμό της γλυκόζης ακινητοποιώντας το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης μέσω της γλουταραλδεΐδης (Chaichi and Alijanpour, 2016).

Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αξαρχή Ειρήνη. Πρωτεϊνική μηχανική και χαρακτηρισμός του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου. Διδακτορική διατριβή, ΓΠΑ, 2009.

Κλώνης Ιωάννης. Ενζυμολογία , εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αιγάλεω, 2007.

Κλώνης Ιωάννης. Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο, 2011.

Χρονοπούλου Ευαγγελία. Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα μέτρησης ξενοβιοτικών ενώσεων. Διδακτορική διατριβή, ΓΠΑ, 2013.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

[BIBΛΙΟ] Fundamentals of enzyme kinetics
A Cornish-Bowden, A Cornish-Bowden – 2012.

Ahmad, L.; Rylott, E. L.; Bruce, N. C.; Edwards, R.; Grogan, G. Structural evidence for Arabidopsis glutathione transferase *AtGSTF2* functioning as a transporter of small organic ligands. *FEBS Open Bio.*, 2017, 7, 122-132.

Akhtar Fayaz, Mubashir Husain, Rehmania Martin Reisslein. White space: Definitional perspectives and their role in exploiting spectrum opportunities. 2016. *Telecommunications Policy*. Volume 40, Issue 4, April 2016, Pages 319-331.

Akiva E, S Brown, G Holliday, P Babbitt - *The FASEB Journal*, 2015 – FASEB

Alberts Mark J., Deepak L. Bhatt, Jean-Louis Mas E., Magnus Ohman Alan T., Hirsch Joachim, Röther Geneviève, Salette Shinya, Goto Sidney C., Smith, Jr Chiau-Suong Liao. Three-year follow-up and event rates in the international REduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry. 2009. *European Heart Journal*, Volume 30, Issue 19, Pages 2318–2326.

Alias Zazali, Alan G. Clark. Studies on the glutathione S-transferase proteome of adult *Drosophila melanogaster*: Responsiveness to chemical challenge. 2007. *Wiley Online Library*. 7(19): 3618-3628.

Ali-Osman F., Lopez-Berestein G., Buolamwini J., Antoun G., Lo H.W., Keller C., Akande O. (1998). Glutathione S-transferase genes in cancer.

Allan J.M., C.P. Wild, S. Rollinson, E.V. Willett, A.V. Moorman, G.J. Dovey, P.L. Roddam, E. Roman, R.A. Cartwright, G.J. Morgan. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 11592–11597.

Allen Richard P, Daniel Picchiatti, Wayne A Hening, Claudia Trenkwalder, Arthur S Walters, Jacques Montplaisi. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. 2003. Volume 4, Issue 2, Pages 101–119.

Allen, I. Elaine, Seaman, Jeff. *Seizing the Opportunity: The Quality and Extent of Online Education in the United States*, 2002.

Allocati N, Favaloro B, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. 2003. Proteus mirabilis glutathione S-transferase B11 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem. J.* 373:305–11

Alnæs Dag, Markus H. Snevea, Geneviève Richard, Kristina C. Skåtun, Tobias Kaufmann, Jan Egil, Nordvik, Ole A. Andreassen, Tor Endestad, Bruno Laenga, Lars T. Westlyea. Functional connectivity indicates differential roles for the intraparietal sulcus and the superior parietal lobule in multiple object tracking. 2015. *NeuroImage*. Volume 123, Pages 129-137.

Alper Nuhoglu, Beste Yalcin. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*. 2005, 40: 1233-1239.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-10.

Amaral Katey G., Anthony E. English, Diptiman D. Bose, Shabnam N. Sani, Alan B. Moy. microfluidic biosensor array for endothelial and cancer cell co-culture interaction studies. 2011. *IEEE Xplore*. 15(1);651-663.

Ambigaipalana P., R. HooveraE. Donnerb Starch chain interactions within the amorphous and crystalline domains of pulse starches during heat-moisture treatment at different temperatures and their impact on physicochemical properties. *Food Chemistry*. Volume 143, 15 January 2014, Pages 175-184.

Amine A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G., Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition, 2016, *Biosens. & Bioelec.* 76, 180-194

An JH, Blackwell TK. 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* 17:1882–93

Andreescu, S., Magearu, V., Lougarre, A., Fournier, D., Marty, J.-L., 2001. Immobilization of enzymes on screen printed sensors via an histidine tail. Application to the detection of pesticides using modified cholinesterase. *Anal. Lett.* 34 (4), 529–540.

Andreou V.G., Clonis Y.D., Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione-S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine, 2002, *An Chem Acta* 460, 151-161

Anne M. Fitzpatrick, Dean P. Jones, and Lou Ann S. Brown. Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012, 17(2): 375-408.

Arya Sunil K., Monika Dattab Bansi D. Malhotra. *Biosensors and Bioelectronics*.

Ataya Farid S. Abdul, AzizAl-Jafaria, Mohamed S.Daoud, Amal Abdulaziz, Al-Hazzanid, Afaf Ibrahim, Shehatad Hesham, M. Saeeda Dalia Fouadef. Genomics, phylogeny and in silico analysis of mitochondrial glutathione S-transferase-kappa from the camel *Camelus dromedaries*. 2014. Elsevier. 97(1): 46-54.

Attacha Safira, David Solbach, Krisztina Bela, Anna Moseler, Stephan Wagner, Markus Schwarzländer, Isabel Aller, Stefanie J. Müller, Andreas J. Meyer. Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. 2017. *Plant, Cell & Environment*. 40(8): 1281-1295.

Axarli A. Irine, Daniel J. Rigden, Nikolaos E. Labrou. Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. 2004. *Biochemical Journal*. 2004,382(3)885-893.

Axarli I, Dhavala P, Papageorgiou AC, Labrou NE: Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *J Mol Biol* 2009, 385:984-1002.

Axarli I, Labrou NE, Petrou C, Kordopatis P, Rassias N, Clonis YD. (2009c). Sulphonamide-based bombesin prodrug analogues for glutathione S-transferase, useful in targeted cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2009-2016.

Axarli Irine , Abdi W. Mulet, Evangelia G. Chronopoulou, Anastassios C. Papageorgiou, Nikolaos E. Labrou. Directed evolution of glutathione transferases towards a selective glutathione-binding site and improved oxidative stability. 2017. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1861(1): 3416-3428.

Axarli, I.; Muleta, A. W.; Vlachakis, D.; Kossida, S.; Kotzia, G.; Maltezos, A.; Dhavala, P.; Papageorgiou, A. C.; Labrou, N. E. Directed evolution of Tau class glutathione transferases reveals a site that regulates catalytic efficiency and masks cooperativity. *Biochem J*, 2016, 473, 559-570.

Babbitt Patricia, Brown, SD, Babbitt, PC. New insights about enzyme evolution from large scale studies of sequence and structure relationships. 2014, (2): 23-26.

Bahadir E.B. & Sezginturk M.K., Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental and biothreat/biowarfare analyses, 2015, *Anal Biochem*, 107-120

Ballatori N., S.M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C.L. Hammond, Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biol. Chem.* 390 (2009) 191–214.

Bathige, Navaneethaiyer Umasuthan, G.I. Godahewa, William Shanthakumar, Thulasitha, Ilson Whang, Seung Hwan, Wonc Chul Kimd, Jehee Leeab. Two variants of selenium-dependent glutathione peroxidase from the disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular characterization and immune responses to bacterial and viral stresses. 2015. *Fish & Shellfish Immunology*. 45(2): 648-655.

Belchik Sara M., Luying Xun. S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. 2011. Taylor Francis online. 43(2): 307-316.

Bennion Brian J., Valerie Daggett. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(9): 5142–5147.

Bernat B.A., Laughlin L.T. and Armstrong R.N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochem.* 36, 3050-3055.

Bernig Toralf, Stephen J Chanock. Challenges of SNP genotyping and genetic variation: its future role in diagnosis and treatment of cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* Volume 6, 2006 - Issue 3. Pages 319-331.

Berning T., Chankock S. J. (2006). Challenges of SNp genotyping and genetic variation: its future role in diagnosis and treatment of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 319-331.

Board G. Philip, Deepthi Menon. Structure, function and disease relevance of Omega-class glutathione transferases. 2016. *Springer Link.* 90(5): 1049-1067.

Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Eastel S., Jermiin L.S., Sculte G.K., Danley D.E., Holth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Ronsner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghean K.F., Pandit J. (2000). Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275,24789-24806.

Board, P.; Menon, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Science Direct.*, 2013, 5, 3267–3288.

Bowatte G., C. Lodge, A. J. Lowe, B. Erbas, J. Perret, M. J. Abramson, M. Matheson, C. Dharmage. The influence of childhood traffic-related air pollution exposure on asthma, allergy and sensitization: a systematic review and a meta-analysis of birth cohort studies. Volume 70, Issue 3. March 2015. Pages 245–256.

Brazil de Oliveira, P.R., Nunes, G.S., Santos, T.C.R., Andreescu, S., Marty, J.-L., 2004. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*. Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.* 20, 825–832.

Broussard G. Joseph, Jennifer Mytar, Rung-chi Li, Gloria J. Klapstei. The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. 2012. 20(3), pp 109–126.

Brown Shoshana D., Patricia C. Babbitt. New Insights about Enzyme Evolution from Large Scale Studies of Sequence and Structure Relationships. 2015. (5): pp:65-69.

Butterworth Peter J. Frederick, J. Warren Terri, Grassby Hamung, Patel Peter R. Ellis. Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics. Springer Link. 2012, 87: 2189-2197.

Cai Jinling, Guangce Wang. Photo-biological hydrogen production by an acid tolerant mutant of *Rhodovulum sulfidophilum* P5 generated by transposon mutagenesis. 2014. Springer Link. 154: 254-259.

Cardona Carlos A. , Óscar J. Sánchez. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007. Volume 98, Issue 12, 2415-2457.

Chatzikonstantinou Marianna, Aikaterini Kalliampakou, Melissanthe Gatzogia, Emmanouil Fletmetakis, Pantelis Katharios, Nikolaos E. Labrou. Comparative analyses and evaluation of the cosmeceutical potential of selected *Chlorella* strains. 2017. *Journal of Applied Phycology*. February 2017, Volume 29, Issue 1, pp 179–188.

Chen Yu-Hsin, Tushar Krishna, Joel S. Emer, Vivienne Sze. Eyeriss: An Energy-Efficient Reconfigurable Accelerator for Deep Convolutional Neural Networks. 2017. *IEEE Xplore*. 55(1): 127-138.

Cheng Feng, Jian-Miao Xu, Chao Xiang, Zhi-Qiang Liu, Li-Qing Zhao, Yu-Guo Zheng. Simple-MSSM: a simple and efficient method for simultaneous multi-site saturation mutagenesis. 2017, Volume 39, Issue 4, pp 567–575.

Childers Christine, Stuart R. Green, Neal J. Dawson, Kenneth B. Storey. Native denaturation differential scanning fluorimetry: Determining the effect of urea using a quantitative real-time thermocycler. 2016, *Analytical Biochemistry*, Volume 508, Pages 114-117.

Cho Ha Yeon, Seo Jin Maeng, Hyo Je Cho, Yoon Seo Choi, Jeong Min Chung, Sangmin Lee, Hoi Kyoung Kim, Jong Hyun Kim, Chi-Yong Eom, Yeon-Gil Kim, Min Guo, Hyun Suk Jung, Beom Sik Kang, Sunghoon Kim. Assembly of Multi-tRNA Synthetase Complex via Heterotetrameric Glutathione Transferase-homology Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 2015. 290:29313-29328.

Choi Jeong-Woo, Young-Kee Kim, Sun-Young, Song In-ho Lee, Won, Hong Lee, Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan. 2003. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 18, Issue 12, Pages 1461-1466.

Choi, J.-W., Kim, Y.-K., Song, S.-Y., Lee, I.-H., Lee, W.H., 2003. Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan. *Biosens. Bioelectron.* 18, 1461–1466.

Chopra Ian, Alexander J O'Neill, Keith Miller. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. 2003. *Drug Resistance Updates*.

Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C., Chovelon, J.-M., 2005. A bienzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosens. Bioelectron.* 21, 273–281.

Chronopoulou E, Madesis P, Asimakopoulou B, Platis D, Tsaftaris A, Labrou NE: Catalytic and structural diversity of the fluzafop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 2012, 235:1253-1269.

Chronopoulou E, Madesis P, Tsaftaris A, Labrou NE: Cloning and characterization of a biotic-stress-inducible glutathione transferase from *Phaseolus vulgaris*. *Appl Biochem Biotechnol* 2014, 172:595-609.

Chronopoulou Evangelia, Farid S. Ataya, Fotini Pouliou, Fereniki Perperopoulou, Nikolaos Georgakis, Irini Nianiou-Obeidat, Panagiotis Madesis, Elisavet Ioannou, Nikolaos E. Labrou. Structure, Evolution and Functional Roles of Plant Glutathione Transferases. 2017. Springer Link. 195-213.

Chronopoulou, E. G.; Labrou, N. E. Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology, *Rec. Pat. Biotech.*, 2009, 3, 211-223.

Chun Youa, Xiao-Zhou Zhanga, Y.-H. Percival Zhang. Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. 2017, (62): pp 65-71.

Çolak Özlem, Ahmet Yaşar, Servet Çete, Fatma Arslan. Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly (vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde, 2012. Taylor & Francis Online.

Coles, Brian F., and Fred F. Kadlubar. "Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease " *Methods in Enzymology* 401 (2005): 9-42.

Cooper M.A., Singleton V.T., A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions, 2007, *J Mol Recognit* 20, 154-184.

Covolo L., Placidi D., Gelatti U., Carta A., Scotto Di Carlo A., Lodetti P., Picciche A., Orizio G., Campagne M., Arici C., Porru S. (2008). Bladder cancer, GSTs, NAT1, NAT2, SUT1A1, XRCC1, XRCC3, XPC genetic polymorphisms and coffee consumption: a case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* 23, 355-360.

Craft S., J. Ekena, B. Mayer, D. H. Thamm, C. Saba, R. Chun, L. A. Trepanier. Characterization of a low expression haplotype in canine glutathione S-transferase (GSTT1) and its prevalence in golden retrievers. 2018, Pages E61-E67.

Crew, A., Hart, J.P., Wedge, R., Marty, J.-L., Fournier, D., 2004. A screen-printed, amperometric, biosensor array for the detection of organophosphate pesticides based on inhibition of wild type, and mutant acetylcholinesterases, from *Drosophila melanogaster*. *Anal. Lett.* 37, 1601–1610.

Cristina Espinosa-Díeza, Verónica Miguella, Susana Vallejob, Francisco J. Sáncheza, Elena Sandovala, Eva Blancoa, Pablo Cannata, Concepción Peirób Carlos, F.Sánchez-

Ferrer, Santiago Lamasa. Role of glutathione biosynthesis in endothelial dysfunction and fibrosis. 2018. *Redox Biology*. 14: 88-89.

Cui Honggang, Zhiyun Chen, Sheng Zhong, Karen L. Wooley, Darrin J. Pochan. Block Copolymer Assembly via Kinetic Control. 2007. *Science*. Vol. 317, Issue 5838, pp. 647-650.

Cummins, I.; Dixon, D. P.; Freitag-Pohl, S.; Skipsey, M.; Edwards, R., Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification, *Drug Metab. Rev.*, 2011, 43, 266-280.

Currin Andrew, Neil Swainston, Philip J. Day, Douglas B. Kell. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. 2015. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 1172-1239

Dalle-Donne I., R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 85–96.

Damborsky Jiri, Jan Brezovsky. Computational tools for designing and engineering enzymes. 2014. *Current Opinion in Chemical Biology*. Volume 19, April 2014, Pages 8-16.

Dams Thomas, Günter Auerbach, Gerd Bader, Uwe Jacob, Tarmo Ploom, Rainer Jaenicke. The crystal structure of dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima*: molecular features of thermostability. 2000. *Journal of Molecular Biology*. Volume 297, Issue 3, Pages 659-672.

Danet, A.F., Bucur, B., Cheregi, M.-C., Badea, M., Serban, S., 2003. Spectrophotometric determination of organophosphoric insecticides in FIA system based on AChE inhibition. *Anal. Lett.* 36 (1), 59–73.

Daniel R.M. The upper limits of enzyme thermal stability. 1996. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 19(1) Pages 74-79.

Denard Carl, Hengqian Ren, Huimin Zhao. Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution. *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*. Springer. 2015, Volume 25, Pages 55-64.

DesikanR, A- H- Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. 2001. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127:159–72

Di Roberto Raphaël, Benjamin M. Scott, Sergio G. Peisajovich. Directed Evolution Methods to Rewire Signaling Networks. *Synthetic Protein Switches*. 2017, (54): pp 321-337.

Dixit Anand, Alan Wood. The impact of new technology on soft error rates. 2011. 63:789-795.

Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. (1998). Glutathione mediated detoxification system in plants. *Curr. Opini. Plant Biol.* 1, 258-266.

Dixon DP, Laphorn A, Madesis P, Mudd EA, Day A, Edwards R: Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J Biol Chem* 2008, 283:20268-20276.

Dixon DP, Sellars JD, Edwards R: The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem J.*, 2011, 438:63-70.

Dixon, D. P.; Edwards, R. Roles for Stress-inducible Lambda Glutathione Transferases in Flavonoid Metabolism in Plants as Identified by Ligand Fishing. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 36322-36329.

Dixon, D. P.; Laphorn, A.; Edwards, R. Plant glutathione transferases, *Gen. Biol.*, 2002, 3, 1-10.

Dixon, D. P.; Skipsey, M.; Edwards, R., Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, *Phytochem.*, 2010, 71, 338-350.

Dixon, D.P.; Edwards, R. Selective Binding of Glutathione Conjugates of Fatty Acid Derivatives by Plant Glutathione Transferases. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 21249-21256.

Dixons D.P., Laphorn A., Edwaeds R. (2002). Protein family review. Plant glutathione transferases. *Gerome Biol.*3 : 3004.1-3004.10.

Dongzhi Lia, Qinggang Gaoc, Li Xua, Sen Panga, Zhiqian Liud, Chengju Wanga, Weiming Tan. 2017. Characterization of glutathione S-transferases in the detoxification of metolachlor in two maize cultivars of differing herbicide tolerance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Volume 143, Pages 265-271.

D'Orazio Paul. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta.* 2003, Volume 334, Issues 1–2, Pages 41-69.

Dowd A.J., Morou E., Steven A., Ismail H.M., Labrou N., Hemingway J., Paine M.J.I., Vontas J., Development of a colourimetric pH assay for the quantification of pyrethroids based on glutathione-Stransferase, 2010, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90:12, 922-933

Down A.J., Steven A., Morou E., Hemingway J., Vontow J., Paine M.J.I. (2010). A simple glutathione transferase based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 164-168.

Du Xu , Ivan Skachko, Anthony Barker, Eva Y. Andrei. Approaching ballistic transport in suspended graphene. 2008. *Letter. Nature Nanotechnology* volume3, pages491–495(2008).

Edwards Martin , Anthony J. Richardson. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. 2004. *Nature.* 430: pages881–884.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V: Plant glutathione Stransferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 2000, 5:193-198.

Eklund A., C. Rudberg¹, S. Smedberg², L. K. Enander³, C. E. Leijonmarck⁴, J. Österberg⁵, A. Montgomery. Short-term results of a randomized clinical trial comparing Lichtenstein open repair with totally extraperitoneal laparoscopic inguinal hernia repair. Article first published online: 24 JUL 2006 DOI: 10.1002/bjs.5405.

Emond Stéphane, Florian Hollfelder, Nobuhiko Tokuriki. Enzyme evolution and engineering using insertions and deletions. ENZYME ENGINEERING XXIV. 2017.

Enayati Ahmad Ali, Christian Lengeler, Tobias Erlange, Janet Hemingway. Field evaluation of a recombinant glutathione S-transferase-based pyrethroid quantification assay. 2005. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 99, Issue 5, Pages 369–378.

Eriksen Marcus, Sherri Mason, Stiv Wilsona, Carolyn Boxa, Ann Zellers, William Edwards, Hannah Farley. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. 2013. Marine Pollution Bulletin. Volume 77, Issues 1–2, 177-182.

Fágáin Ciarán Ó. Understanding and increasing protein stability. 1995. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. Volume 1252, Issue 1, Pages 1-14.

Fan Jianqing, Irene Gijbels. Data-Driven Bandwidth Selection in Local Polynomial Fitting: Variable Bandwidth and Spatial Adaptation. 1995. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological). Vol. 57, No. 2 (1995), pp. 371-394.

Fedets OM. Structure and functions of glutathione transferases. 2014. Europe PMC. 86 (3): 23-32.

Feiyi Wang, Li Zhou, Chunchang Zhao, Rui Wang, Qiang Fei, Sihang Luo, Zhiqian Guo, He Tian, Wei-Hong Zhu. A dual-response BODIPY-based fluorescent probe for the discrimination of glutathione from cysteine and homocysteine. Royal society of chemistry. 2015, 6: 2584-2589.

Fernández-Checa J., N. Kaplowitz, C. Garcia-Ruiz, A. Colell, M. Miranda, M. Mai, E. Ardite, A. Morales, GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect, Am. J. Physiol. 273 (1997) G7–G17.

Flanagan Jach, Smythe Mark (2011). Sigma-class glutathione transferases. Drug Metabolism Reviews. Volume 43, 2011 - Issue 2.

Forman H.J., H. Zhang, A. Rinna, Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, Mol. Aspects Med. 30 (2009) 1–12.

Forman M. Evan, Meghan L. Butryn. A new look at the science of weight control: How acceptance and commitment strategies can address the challenge of self-regulation. Springer Link. 2015. 84: 171-180.

Fourou Hana, Ali Zazoua, Mohamed Braiek, Nicole Jaffrezic-Renault. An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of

cadmium (II) and chromium (VI), 2016. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, pages 872-885.

Fragoulaki M.K., Axarli I.A., Labrou N.E., Clonis Y.D. (2007). Recombinant glutathione S-transferase for the determination of the herbicide alachlor : The foundations of an optical biosensor. 1st UK-US Conference on Chemical and Biological Sensors and Detectors London, UK.

Fujikawa Y, Urano Y, Komatsu T, Hanaoka K, Kojima H, Terai T, Inoue H, Nagano T. (2008). Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione S-transferase and application for activity imaging in living cells. *J Am Chem Soc.*, 130(44):14533-43.

García-Jiménez Custodia, Jose Manuel García-Martínez, Ana Chocarro-Calvo, Antonio De la Vieja. A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/ β -catenin signaling by high glucose. 2014. *Society of endocrinology*.52(2): 354-362.

Garcia-Ruiz C., J.C. Fernández-Checa, Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21 (2006) S3–S6.

Gardner JL, Gallagher EP. 2001. Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase Alpha4-4(hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 390:19– 2

Gerhke Jason M, Oliver R, Cervantes, M. Kendell Clement, Luca Pinello, J. Keith Joung. High-precision CRISPR-Cas9 base editors with minimized bystander and off-target mutations. 2016. *bioRxiv*. pp 1325-1330.

Goekkurt E, J Stoehlmacher. Is thymidylate synthase a reliable predictor for response and survival during hepatic arterial infusion for hepatic metastasis from colorectal cancer. *British Journal of Cancer* (2006) 95, 1306–1307.

Gogol, E.V., Evtugyn, G.A., Marty, J.-L., Budnik, H.C., Winter, V.G., 2000. Amperometry biosensor based on nation coated screen-printed electrodes for determination of cholinesterase inhibitors. *Talanta* 53, 379–389

Gonçalves Renata, Ariane Zamoner, Leila Zanatta, Ana Paula Zanatta, Aline Pertile Remor, Débora da Luz Scheffer, Alexandra Latini, Fátima Regina Mena Barreto Silva. 1,25(OH)₂ vitamin D3 signalling on immature rat Sertoli cells: gamma-glutamyl transpeptidase and glucose metabolism. 2017. *Springer Link*. 11: 233-243.

Govindarajan S, Mannervik B, Silverman JA, Wright K, Regitsky D, Hegazy U, Purcell TJ, Welch M, Minshull J, Gustafsson C: Mapping of amino acid substitutions conferring herbicide resistance in wheat glutathione transferase.

Grundy JE, Storey KB. 1998. Antioxidant defences and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol. B* 168:132– 42

Guilbault, M. Pravda, M. Kreuzer, C. K. O'Sullivan. *Biosensors—42 Years and Counting*. 2004. 37: Pages 1481-1496.

Gunning Vanda, Kyriakos Tzafestas, Helen Sparrow, Emily J. Johnston, Andrew S. Brentnall, Jennifer R. Potts, Elizabeth L. Rylott, Neil C. Bruce. Arabidopsis Glutathione Transferases U24 and U25 Exhibit a Range of Detoxification Activities with the Environmental Pollutant and Explosive, 2,4,6-Trinitrotoluene. 2014. *Plant Physiology*. 114;156-163.

Habdous Mohammed, Monique Vincent-Viry, Sophie Visvikis, Gérard Siest. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. 2002. *Clinica Chimica Acta*. Volume 326, Issues 1–2, Pages 131-142.

Hall A. Small GTP-Binding Proteins and the Regulation of the Actin Cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology*. Vol. 10: 31-54 (Volume November 1994).

Hall J. L., Lorraine E. Williams. Transition metal transporters in plants. 2003. *Journal of Experimental Botany*. 54(393): 2601–2613.

Hasegawa Shinpei, Satoshi Horike, Ryotaro Matsuda, Shuhei Furukawa, Katsunori Mochizuki, Yoshinori Kinoshita, and Susumu Kitagaw. Three-Dimensional Porous Coordination Polymer Functionalized with Amide Groups Based on Tridentate Ligand: Selective Sorption and Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129 (9), pp 2607–2614.

Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferase. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.

Hayes JD, Pulford DJ. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445–600

He Guang S., Loon-Seng Tan, Qingdong Zheng, Paras N. Prasad. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.*, 2008, 108 (4), pp 1245–1330.

Hegazy, U.M. Mannervick, B., Stenberg, G.J. (2004). Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase P1-1. *J. Biol. Chem.* 279, 9586-9596.

Henry Jay, Forman Hongqiao, Zhang Alessandra, Rinna. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. 2009. *Molecular Aspects of Medicine*. 30(1-2): 1-12.

Hodges, R. E.; Minich, D. M. Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *J. of Nutr. and Met.*, 2015, 2015, 1-23.

Hofmann Lukas, Sahil Gulati, Avery Sears, Phoebe L. Stewart, Krzysztof Palczewski. An effective thiol-reactive probe for differential scanning fluorimetry with a standard

real-time polymerase chain reaction device. 2016. *Analytical Biochemistry*, Volume 499: Pages 63-65.

Hollfelder Florian, University of Cambridge, United Kingdom. Microfluidic droplets as tools for high-throughput biology: Enzyme evolution, recruitment and discovery based on catalytic promiscuity. *Enzyme Engineering XXIV*, 2017, pages: 24-28.

Hong Qian, Elliot L. Elson. Single-molecule enzymology: stochastic Michaelis–Menten kinetics. *Biophysical Chemistry*. 2002, 101-102: 565-576.

Hou Pingping, Yanqin Li, Xu Zhang, Chun Liu, Jingyang Guan, Honggang Li, Ting Zhao, Junqing Ye, Weifeng Yang, Kang Liu, Jian Ge, Jun Xu, Qiang Zhang, Yang Zhao, Hongkui Deng. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. 2013. *Science* 09 Aug 2013: Vol. 341, Issue 6146, pp. 651-655.

Hu Wana, Sha Zhana, Xiangdong Xiaa, Pengfei Xua, Hong Youa, Byung Rae, Jinab Jianhong Lia. Identification and functional characterization of an epsilon glutathione S-transferase from the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2016, 132: 81-88.

Hwang C., A.J. Sinsky, H.F. Lodish, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science* 257 (1992) 1496–1502.

Ishimoto T.M., F. Ali-Osman, Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* 12 (2002) 543–553.

Ivarsson Ylva , Malena A. Norrgård, Ulf Hellma, Bengt Mannervik. Engineering the enantioselectivity of glutathione transferase by combined active-site mutations and chemical modifications. 2007. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1770(9): 1374-1381.

Jacquot J. P., K. J. Dietz, N. Rouhier, E. Meux, P. A. Lallement, B. Selles, A. Hecker. Redox Regulation in Plants: Glutathione and “Redoxin” Related Families. 2013. *Oxidative Stress and Redox Regulation*. Springer Link. 65: 213-231.

Jaenicke Rainer. Stability and stabilization of globular proteins in solution. 2000. *Journal of Biotechnology*. Volume 79, Issue 3, 193-203.

Jae-Wan Jung, Se-Hui Jung, Hyun-Soo Kim, Jong Seol Yuk, Jae-Bong Park, Young-Myeong Kim, Jeong-A Han, Pyung-Hyun Kim, Kwon-Soo Ha. High-throughput analysis of GST-fusion protein expression and activity-dependent protein interactions on GST-fusion protein arrays with a spectral surface plasmon resonance biosensor. 2006. Volume 6, No .4, Pages 1110–1120.

Jaffrezic-Renault Nicole. New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides. 2001. *Sensors* 2001, 1(2), 60-74.

Jain M, Ghanashyam C, Bhattacharjee A: Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics* 2010, 11:73.

Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Prot. Sci.* 8, 689-692.

Jia, B.; Sun, M.; Sun, X.; Li, R.; Wang, Z.; Wu, J.; Wei, Z.; DuanMu, H.; Xiao, J.; Zhu, Y. Overexpression of GsGSTU13 and SCM RP in *Medicago sativa* confers increased salt-alkaline tolerance and methionine content. *Physiol. Plant.*, 2016, 156, 176-189.

Jiang Nan. Beam damage by the induced electric field in transmission electron microscopy. 2016. *Micron.* 93: 79-92.

Jing Cui, Ling Ge Li, Peng Jiang, Ruo Dan Liu, Xuan Yang, Li Na Liu, Pei Liu, Shuai Bing Zhang, Zhong Quan Wang Biochemical and functional characterization of the glutathione S-transferase from *Trichinella spiralis*. *SpringerLink.* 2015, 14: 2007–2013.

Johanna A. Joyce, Douglas T. Fearon. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. 2015. *Science* 03:Vol. 348 :6230, pp. 74-80.

Johansson Malin E. V., Jessica M. Holmén Larsson and Gunnar C. Hansson. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *PNAS* 2011 March, 108 (Supplement 1) 4659-4665.

Joshi Swati, Tulasi Satyanarayana. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. *Bioresource Technology.* Volume 176, January 2015, Pages 273-283.

Justino C.I.L., Freitas A.C., Pereira R., Duarte A.C., Santos T.A.P.R., Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors, 2015, *Trends in Anal. Chem.*, 68:2-17

Kalinina E. V., N. N. Chernov, M. D. Novichkova. Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of RedoxDependent Processes. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, 79: 1562-1583.

Kaplowitz N., T.Y. Aw, M. Ookhtens, The regulation of hepatic GSH, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25 (1985) 714–744.

Kapoli P. Axarli I.A., Platis D., Fragoulaki M., Pain M., Hemingway J., Vontas J., Labrou N.E. (2008). Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosens Bioelectron* 24, 498-503.

Kapoor Swati, Aasima Rafiq, Savita Sharma. Protein engineering and its applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 57, 2017 - Issue 11, Pages 2321-2329.

Kawasaki Hiroshi, Hirofumi Suemori, Kenji Mizuseki, Kiichi Watanabe, Fumi Urano, Hiroshi Ichinose, Masatoshi Haruta, Masayo Takahashi, Kanako Yoshikawa, Shin-Ichi Nishikawa, Norio Nakatsuji and Yoshiki Sasai. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. 2002. *PNAS*. 99 (3) 1580-1585.

Keller C., Ballard L., Lemmons R., Ali-Osman F. (2006) US20060194200.

Kerman Kagan, Masato Saito, Eiichi Tamiya, Shohei Yamamura, Yuzuru Takamura. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. 2008. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Volume 27, Issue 7, Pages 585-592.

Kikuchi Akio, Atsushi Takeda, Hiroshi Onodera, Teiko Kimparaa, Kinya Hisanaga, Nobuyuki Satoc, Akihiko Nunomura, Rudy J. Castellanie, George Perrye, Mark A. Smithe, Yasuto Itoyama. Systemic Increase of Oxidative Nucleic Acid Damage in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. 2002. *Neurobiology of Disease*. 9(2): 244-248.

Kim Y.-J., H. Uyama. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Springer Links*. 2005, 62: 1707–1723.

Kissoudis Christos, Chrissanthi Kalloniati, Emmanouil Flemetakis, Panagiotis Madesis, Nikolaos E. Labrou, Athanasios Tsiftaris, Irini Nianiou-Obeidat. Stress-inducible GmGSTU4 shapes transgenic tobacco plants metabolome towards increased salinity tolerance. 2015. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:102.

Kissoudis Christos, Chrysanthi Kalloniati, Emmanouil Flemetakis, Panagiotis Madesis, Nikolaos E. Labrou, Athanasios Tsiftaris, Irini Nianiou-Obeidat. Maintenance of metabolic homeostasis and induction of cytoprotectants and secondary metabolites inalachlor-treated GmGSTU4-overexpressing tobacco plants, as resolved by metabolomics. 2015. *Plant Biotechnology Reports*, Volume 9, Issue 5, pp 287–296.

Knecht Wolfgang, Monika Löffler. Redoxal as a new leadstructure for dihydroorotate dehydrogenase inhibitors: a kinetic study of the inhibition mechanism. *Febs Letters*. 2000, 467: 27-30.

Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, Osanai H, Nishikawa K, et al. 2002. Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* 7:807–20

Kok, F.N., Hasirci, V., 2004. Determination of binary pesticide mixtures by an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor. *Biosens. Bioelectron*. 19, 661–665.

Korotkaya E.V., *Biosensors: Design, Classification and Applications in the food industry*, 2014, *Foods and Raw Materials*, 2(2)161-171

Kou S. C., Binny J. Cherayil, Wei Min, Brian P. English, X. Sunney Xie. Single-Molecule Michaelis–Menten Equations. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109 (41), pp 19068–19081.

Koutsoumpli G.E., Dimaki V., Thireou T., Eliopoulos E., Labrou N., Varvounis G., Clonis Y. Synthesis and Study of 2-(Pyrrolo-sulfonylmethyl)-N-arylimines: A New Class of Inhibitors for Human Glutathione Transferase A1-1. *J. Med Chem.* 55 (2012) 6802-6212.

Kumar Ashutosh , Brajesh Kumar, Singha Israr Ahmad, Smriti Shukla, Devendra Kumar, Patela Garima, Srivastava Vinod, Kumara Haushila, Prasad Pandey, Chetna Singh. Involvement of NADPH oxidase and glutathione in zinc-induced dopaminergic neurodegeneration in rats: Similarity with paraquat neurotoxicity. 2012. *Brain Research.* 1438: 14-64.

Kumar S., R. Nussinov. How do thermophilic proteins deal with heat? 2001. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* Volume 58, Issue 9, pp 1216–1233.

Kumwenda Chiza, Kathryn G Dewey, Jaimie Hemsworth, Per Ashorn Kenneth, Maleta Marjorie, J Haskell. Lipid-based nutrient supplements do not decrease breast milk intake of Malawian infants. 2014. *The American Journal of Clinical Nutrition,* Volume 99, Issue 3, Pages 617–623.

Kurtovic Sanela , Olof Modén, Abeer Shokeer, Bengt Mannervik. Structural Determinants of Glutathione Transferases with Azathioprine Activity Identified by DNA Shuffling of Alpha Class Members. 2008. *Journal of Molecular Biology.* 375(5): 1365-1379.

Labade Chaitali P., Abhilash R.Jadhav, Mehul Ahire, Smita S.Zinjarde, Vaijayanti A.Tamhane. Role of induced glutathione-S-transferase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) HaGST-8 in detoxification of pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 2018, Volume 147, Pages 612-621.

Labrou, N. E.; Papageorgiou, A. C.; Pavli, O.; Flemetakis, E. Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr. Opin. Biotechnol,* 2015, 32, 186-194.

Ladner C Robert, Aaron K Sato, Jennifer Gorzelany, Markde Souza. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. 2004. *Springer Link.* 9(12):525-529.

Lallement P-A, Meux E, Gualberto JM, Prosper P, Didierjean C, Saul F, Haouz A, Rouhier N, Hecker A: Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem J* 2014, 462:39-52.

Lallement, P-A.; Brouwer, B.; Keech, O.; Hecker, A.; Rouhier, N. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front Pharmacol,* 2014, 5, 1-22.

Lan, T.; Yang, Z-L.; Yang, X.; Liu, Y-J.; Wang, X-R.; Zeng, Q-Y. Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family. *Plant Cell*, 2009, 21, 3749-3766.

Lane Michael, Burckhard Seelig. Advances in the directed evolution of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, Volume 22, October 2014, Pages 129-136.

Laughlin S., R.R. de Ruyter van Steveninck, J.C. Anderson (1998). The metabolic cost of neural information. *Nature Neuroscience* 1, 36 – 41.

Lee, W.E., Thompson, H.G., Hall, J.G., Bader, D.E., 2000. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using siliconbased biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 14, 784–804.

Lei Yongju, Ruize Sun, Xiangcheng Zhang, Xinjian Feng, Lei Jiang, Oxygen-Rich Enzyme Biosensor Based on Superhydrophobic Electrode.2016. Wiley Online Library, 1477-1481.

Leiers B, Kampkotter A, Grevelding C G, Link CD, Johnson TE, Henkle-Duhrsen K.2003.Astress-responsiveglutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 34:1405– 15

Leland C. Clark Jr., Champ Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Automated and Semi-Automated Systems in Clinical Chemistry*. 2015, Annals of the New York academy of science. Volume102, Issue1, Pages 29-45.

Li G., J. M. Liao, G. Q. Hua, N. Z. Ma, P. J. Wu. Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. 2005. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 20, Issue 10, Pages 2140-2144.

Liang Hui-Juan, Yun-Xiao Zhang, Guang-Fan Hai, Su-Ping Bai, Yong-Liang Yuan, Dan-Dan Ye, Nan-Qian Zhou. Isolation, Structural Elucidation, and Cytotoxicity of Three New ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon japonica* var. *glaucoalyx*. 2013. *Planta Med* 2013; 79(16): 1588

Liang Ying-Chang, Yonghong Zeng, Edward C.Y. Peh, Anh Tuan Hoang. Sensing-Throughput Tradeoff for Cognitive Radio Networks. 2008. *IEEE Xplore*. 7(6) :145-150.

Liu R.M., K.A. Gaston Pravia, Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* (2010) 1–15.

Liu Yawei , Xin Lv, Min Hou, Yawei Shi, Wei Guo. Selective Fluorescence Detection of Cysteine over Homocysteine and Glutathione Based on a Cysteine-Triggered Dual Michael Addition/Retro-aza-aldo Cascade Reaction. *Analytical chemistry*. 2015. 87 (22), pp 11475–1148.

Liu, Y-J.; Han, X-M.; Ren, L-L.; Yang, H-L.; Zeng, Q-Y. Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in *Physcomitrella* patents Reveals

Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants. *Plant Physiol*, 2013, 161, 774-786.

Lu S.C., Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Aspects Med.* 30 (2009) 42–59.

Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M., Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridization detection, 2008, *Anal Chim Acta*, 609: 139-159

Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, 2008, *Biotechnology Advances* 26, 492-500

Mahajan S., W. M. Atkins. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. June 2005, Volume 62, Issue 11, pp 1221-1233.

Maia R.T., Nadvorny D., Molecular Docking of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* Glutathione S-Transferases Epsilon 2 (GSTE2) Against Usnic Acid: an Evidence of Glutathione Conjugation, 2014, *Braz Arch Biol Technol* 57(5): 689-694

Malik Ajamaluddin , Dalia Fouad, Nikolaos E.Labrou, Abdulrahman M. Al-Senaidy, Mohamed A. Ismaela, Hesham M. Saeede, Farid S.Ataya. Structural and thermodynamic properties of kappa class glutathione transferase from *Camelus dromedaries*. 2016. Elsevier. 88: 313-319.

Manda Xiao, Fuzhi Huang, Wenchao Huang, Yasmina Dkhissi , Ye Zhu, Joanne Etheridge, Angus Gray-Weale, Udo Bach, Yi-Bing Cheng, Leone Spiccia. A Fast Deposition-Crystallization Procedure for Highly Efficient Lead Iodide Perovskite Thin-Film Solar Cells. Volume 126, Issue 37. pages 10056–10061.

Mannervik B: Five decades with glutathione and the GSTome. *J Biol Chem* 2012, 287:6072-6083.

Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988) Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev.Biochem.* 23, 283-337.

Maria Giovanna Chini, Claudia Ferroni, Vincenza Cantone, Paolo Dambrosio, Greta Varchi, Antonella Pepe, Katrin Fischerd, Carlo Pergola, Oliver Werz, Ines Bruno, Raffaele Riccio, Giuseppe Bifulco. Elucidating new structural features of the triazole scaffold for the development of mPGES-1 inhibitors. *Med. Chem. Commun.*, 2015, 6, 75-79.

Marrazza Giovanna. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. 2014. *Biosensors* 2014, 4(3), 301-317.

Maryam Pakfetrat, Mohammad Hossein Dabbaghmanesh, Zahed Karimi, Alireza Rasekhi, Leila Malekmakan, Mohammad Hossein Nikoo. Prevalence of hypothyroidism and thyroid nodule in chronic hemodialysis Iranian patients. *Springer Link*. 2016. 25: 2154-2162.

Mashiyama ST, Malabanan MM, Akiva E, Bhosle R, Branch MC, Hillerich B, Jagessar K, Kim J, Patskovsky Y, Seidel RD, Stead M, Toro R, Vetting MW, Almo SC, Armstrong RN, Babbitt PC: Largescale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS Biol* 2014, 12:e1001843.

Matea Diana M., Miguel Alcaldeb. *Biotechnology Advances*. 2015, Laccase engineering: From rational design to directed evolution. Volume 33, Issue 1, Pages 25-40.

May M J, Leaver C J. *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. 1994. *PNAS*. 91(21): 10059-10063.

Mazari, A. M. A.; Mannervik, B. *Drosophila* GSTs display outstanding catalytic efficiencies with the environmental pollutants 2,4,6-trinitrotoluene and 2,4-dinitrotoluene. *Biochem and Biophys Rep*, 2016, 5, 141-145.

Mazzetti Anna Paola , Maria Carmela, Fiorile Alessandra, Primavera MarioLo Bello. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. 2015. *Neurochemistry International*. Volume 82, March 2015, Pages 10-18.

Mehrotra P., Biosensors and their application-a review, 2016, *J of Oral Biol and Craniofac Research*, 153-159

Meister, M.E. Anderson, Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 711–760

Meng Feihong, Wei Shia, Yanan Suna, Xuan Zhub, Guisen Wua, Changqing Ruana, Xin Liua, Dongtao Ge. Nonenzymatic biosensor based on CuxO nanoparticles deposited on polypyrrole nanowires for improving detectionrange. 2013. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 42, Pages 141-147.

Menga Xianwei, Jianfei Wei, Xiangling Rena, Jun Rena, Fangqiong Tang. A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H₂O₂-sensitive quantum dots/bi-enzyme. 2013. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 47, 15 September 2013, Pages 402-407.

Miao Edward A , Irina A Leaf, Piper M Treuting, Dat P Mao, Monica Dors, Anasuya Sarkar, Sarah E Warren, Mark D Wewers, Alan Aderem. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. 2010. *Nature Immunology* volume11, pages1136–1142(2010).

Michael Karpusas, Irine Axarli, Lykourgos Chiniadis, Athanasios Papakyriakou, Kostas Bethanis, Katholiki Scopelitou, Yannis D. Clonis, Nikolaos E. Labrou. The Interaction of the Chemotherapeutic Drug Chlorambucil with Human Glutathione Transferase A1-1: Kinetic and Structural Analysis.2013. *PLOS ONE*. 59:145-160.

Mohiuddin M., D. Arbain, A. K. M. Shafiqul Islam, M. S. Ahmad, M. N. Ahmad. Alpha-Glucosidase Enzyme Biosensor for the Electrochemical Measurement of Antidiabetic Potential of Medicinal Plants, 2016. *Springer Link*, 1292-1297.

Mohsenzadeh S, M Esmaili, F Moosavi, M Shahrtash, B Saffari, H Mohabatkar. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. 2001.

Monticolo Francesco, Chiara Colantuono, Maria Luisa Chiusano. Shaping the evolutionary tree of green plants: evidence from the GST family. 2017. *Scientific reports*. 7:14363.

Moon Younghye, Kun Ho Lee, June-Hee Park, Dongho Geum, Kyungjin Kim Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. 2005. *Journal of Neurochemistry*. 93(5): 1199-1208.

Morel Fabric, C.Aninat."The glutathione transferase kappa family." *Drug Metabolism Review* 43(2) (2011): 281-291.

Morgan Barak, Ori Lahav.The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution – basic principles and a simple heuristic description. Volume 68, Issue 11, August 2007, Pages 2080–2084.

Morgan Kevin. *The Learning Region: Institutions, Innovation and Regional Renewal*. *Regional Studies* . Volume 41, 2007.

Morou Evangelia , Hanafy M. Ismaila, Andrew J. Dowda, Janet Hemingway, Nikos Labrou, Mark Painea, John Vontas. A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. *Analytical Biochemistry*. 2008. Volume 378, Issue 1, Pages 60-64.

Mügge Carolin, Robert Kourist. Practical Considerations Regarding the Choice of the Best High-Throughput Assay. 2017, *Protein Engineering*, pp 189-208.

Mukanganyama Stanley, Merhatibeb Bezabih, Metuno Robert, Boneventure T. Ngadjui, Gilbert F. W. Kapche, Francois Ngandeu, Berhanu Abegaz. The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. 2010. 26(4): 460-467.

Nena Pavlidi, John Vontas, Thomas Van Leeuwen. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. 2018, *Current Opinion in Insect Science*, Volume 27, Pages 97-102.

Neufeind Torsten , Robert Huber, Heike Dasenbrock, Lars Prade, Barbara Bieseler. Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. 1997a. *Journal of Molecular Biology*. 274(4): 446-453.

Neufeind Torsten, Robert Huber, Peter Reinemer, Jörg Knäblein, Lars Prade, Karlheinz Mann, Barbara Bieseler. Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. *mutin*: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. 1997b. *Journal of Molecular Biology*. 274(4): 577-587.

Nianiou-Obeidat, I.; Madesis, P.; Kissoudis, C.; Voulgari, G.; Chronopoulou, E.; Tsaftaris, A.; Labrou, N. E. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.*, 2017, 1-15.

Niesen Frank H, Berglund Helena, Vedadi Masoud. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. 2007. *Nature Protocols*, (2): 2212-2221.

Norrgård Malena A., Bengt Mannervik. Engineering GST M2-2 for High Activity with Indene 1,2-Oxide and Indication of an H-Site Residue Sustaining Catalytic Promiscuity. 2011. *Journal of Molecular Biology*. Volume 412, Issue 1, Pages 111-120.

Nunes Catarina, David A. Ferreira, Luís Antunes, Francisco Lobo, Isabel A. Santos, Pedro Amorim. Individual effect-site concentrations of propofol at return of consciousness are related to the concentrations at loss of consciousness and age in neurosurgical patients. 2009. Volume 21, Issue 1, Pages 3–8.

Nunes H, M Humbert, Capron, M Brauner, O Sitbon, J-P Battesti, G Simonneau, D Valeyre. Pulmonary hypertension associated with sarcoidosis: mechanisms, haemodynamics and prognosis. *BMJ*. 61(1):526-532.

Oakley Aaron J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A.P., Parker, M.W. (2005). Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 716-723.

Oakley, Aaron. "Glutathione transferases:a Strucural perspective"*Drug Metabolism Review* 43(2) (2011): 138-151.

Okon Stanley and Niina J. Ronkainen. *Enzyme-Based Electrochemical Glutamate Biosensors*, 2017. Intech, pp: 1457-1461.

Oldenburg J., S.M. Kraggerud, M. Cvancarova, R.A. Lothe, S.D. Fossa, Cisplatininduced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 708–714.

Pakfetrat Maryam, Mohammad Hossein Dabbaghmanesh, Zahed Karimi, Alireza Rasekhi, Leila Malekmakan, Mohammad Hossein Nikoo. Prevalence of hypothyroidism and thyroid nodule in chronic hemodialysis Iranian patients. 2017. 21: 84-89.

Pallardó F.V., J. Markovic, J.L. García, J. Viña, Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation, *Mol. Aspects Med.* 30 (2009) 77–85.

Perperopoulou, F.; Ataya, F. S.; Fouad, D.; Malik, A.; Saeed, H. M.; Labrou, N. E. Biochemical Characterization of the Detoxifying Enzyme Glutathione Transferase P1-1 from the Camel *Camelus Dromedarius*. *Cell Biochem Biophys.*, 2016, 74, 459-472.

Pezzola S., Geroni C., Beria I., Colombo M., Broggin M., Marchini S., Mozzi F. Correction to role of glutathione ransferases in the mechanism of brostallicin activation. *Biochemistry*, 2010, 49 (23), pp 4930-4960.

Ramsay Emma E., Pierre J. Dilda. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. 2014. *Frontiers in Pharmacology*. 59:654-660.

Rasila Tiina S., Maria I.Pajunen, Harri Savilahti. Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction protocols, *Escherichia coli* mutator strain, and hydroxylamine treatment. 2009. *Analytical Biochemistry*. Volume 388, Issue 1, Pages 71-80.

Ravikumar S., Ashutosh Agrahari, S. N. Singh. Mapping the intellectual structure of scientometrics: a co-word analysis of the journal *Scientometrics* (2005–2010). 2015. Springer Link. Volume 102, Issue 1, 929–955.

Ravindra P.Singha, Young Jun, Kima Byung-Keun, Ohab Jeong-Woo Choiab. Glutathione-s-transferase based electrochemical biosensor for the detection of captan. *Electrochemistry Communications*. 2009. 11: 181-185.

Raza H, Robin M-A, Fang J, Avadhani NG. 2002. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem. J.* 366:45–55

Reinemer P, Prade L, Hof P, Neufeind T, Huber R, Zettl R, Palme K, Schell J, Koelln I, Bartunik HD, Bieseler B: Threedimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J Mol Biol* 1996, 255:289-309.

Ren Bing , Hieu Cam, Yasuhiko Takahashi, Thomas Volkert, Jolyon Terragni, Richard A. Young, Brian David Dynlacht. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. 2002.. *Genes*. 32(2): 123-140.

Renata Hans, Z. Jane Wang, Frances H. Arnold. Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution. 2015. *Angewandte chemie*. 54(11): 3351-3367.

Robbins Hilary, Yan Li, Carolina Porras, Michael Pawlita, Arpita Ghosh, Ana Cecilia Rodriguez, Mark Schiffman, Sholom Wacholder, Troy J Kemp, Paula Gonzalez, John Schiller, Douglas Lowy, Mark Esser, Katie Matys, Wim Quint, Leen-Jan van Doorn, Rolando Herrero, Ligia A Pinto, Allan Hildesheim, Tim Waterboer, Mahboobeh Safaeian. Glutathione S-transferase L1 multiplex serology as a measure of cumulative infection with human papillomavirus. 2014. *BMC Infectious Diseases*. 14:120-126.

Robert, X.; Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 320-24.

Robin M-A, Prabu SK, Raza H, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. 2003. Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp 70. *J. Biol. Chem.* 278:18960–70

Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu REV. Plant.Biol.* 59, 143-166.

Ryan G. Coleman, Kim A. Sharp. Shape and evolution of thermostable protein structure. 2010. *Proteins*. Volume 78, Issue 2: 420–433.

Pakorn Winayanuwattikun, Albert J. Ketterman. Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a Delta class glutathione S-transferase. 2004. *Biochemical Journal*. 382(2)751-757.

Pandey Tripti, Sudhir Kumar Singh, Gaurav Chhetri, Timir Tripathi, Arvind Kumar Singh. Characterization of a Highly pH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from *Synechocystis* PCC 6803. 2015. *PLOS*. 10(5): 125-134.

Parbhoo Nishal. Topologically conserved hydrophobic residues of the thioredoxin C-subdomain stabilise GSTs. 2014. *WIREDSpace*.

Pardo Isabel, Susana Camarero. Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, Volume 72, Issue 5, pp 897–910.

Parker Seth J., Christian M. Metallo. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. 2015. *Pharmacology & Therapeutics*. 152: 54-62.

Pavlov, V., Xiao, Yi., Willner, I., 2005. Inhibition of the acetylcholine esterase-stimulated growth of Au nanoparticles: nanotechnology-based sensing of nerve gases. *Nano Lett.* 5, 649–653.

Pengfei Xu, Ningning Han, Tinghao Kang, Sha Zhan, Kwang Sik Lee, Byung Rae Jin, Jianhong Li, Hu Wan. SeGSTo, a novel glutathione S-transferase from the beet armyworm (*Spodoptera exigua*), involved in detoxification and oxidative stress. 2016, *Cell Stress and Chaperones*, Volume 21, Issue 5, pp 805–816.

Platis Dimitris, Nikolaos E. Labrou. Affinity chromatography for the purification of therapeutic proteins from transgenic maize using immobilized histamine. 2008. *Separation Science*. 31(4): 636-645.

Perperopoulou Fereniki, Petros G. Tsoungas, Trias N. Thireou, Vagelis E. Rinotas, Eleni K. Douni, Elias E. Eliopoulos, Nikolaos E. Labrou, Yannis D. Clonis. 2,2'-Dihydroxybenzophenones and their carbonyl N-analogues as inhibitor scaffolds for MDR-involved human glutathione transferase isoenzyme A1-1. 2014. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22(15): 3957-3970.

Pechkova Eugenia, Victor Sivozhelezov, Claudio Nicolini. Protein thermal stability: The role of protein structure and aqueous environment. 2007. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Volume 466, Issue 1, Pages 40-48.

Pouliou Fotini, Perperopoulou Fereniki Labrou, Nikolaos. Comparative Analysis of Two Stress-Inducible tau Class Glutathione Transferases from *Glycine max* Revealed

Significant Catalytic and Structural Diversification. 2017. *Protein and Peptide Letters*. 24(10): 922-935(14).

Picklo Matthew J., Eric K. Long Emilie E. Vomhof-DeKrey. Glutathionyl systems and metabolic dysfunction in obesity. *Nutrition Reviews*, Volume 73, Issue 12, 1 December 2015, Pages 858–868.

Porter Joanne L., Rukhairul A. Rusli, David L. Ollis. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. 2016, Volume 17, Issue 3, Pages 197-203.

Pohanka, Miroslav; Musilek, Kamil; Kuca, Kamil. Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition. 2009. *Current Medicinal Chemistry*, Volume 16, Number 14, May 2009, pp. 1790-1798(9).

Prasad Anjali, Somnath Roy. Role of host switching in the development of pesticide tolerance in *Helopeltis theivora* (Hemiptera: Miridae), the major pest of tea in India. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.) International Journal of Entomology*. Volume 53, 2017 - Issue 6, Pages 428-433.

Safarinejad Mohammad Reza, Nayyer Shafiei, Shiva Safarinejad. Quality of life and sexual functioning in young women with early-stage breast cancer 1 year after lumpectomy. 2013. Volume 22, Issue 6: Pages 1242–1248.

Saluma Samanman, Proespichaya Kanatharana, Wilaiwan Chotigeat, Panchalika Deachamag, Panote Thavarungkulabe. Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water. *Journal of Virological Methods*. 2011, 173: 75-84.

Santos-Aberturas Javier, Mark Dörr, Uwe T. Bornscheuer. Normalized Screening of Protein Engineering Libraries by Split-GFP Crude Cell Extract Quantification. 2017. *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*. *Protein Engineering*, pp 157-170.

Sassolas Audrey, Loïc J. Blum, Béatrice D. Leca-Bouvier. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. 2012. *Biotechnology Advances*

Sau Jay D., Roman M. Lutchyn, Sumanta Tewari, S. Das Sarma. Generic New Platform for Topological Quantum Computation Using Semiconductor Heterostructures. Received 17 July 2009; published 27 January 2010.

Sauer Noel J., Jerry Mozoruk, Ryan B. Miller, Zachary J. Warburg, Keith A. Walker, Peter R. Beetham, Christian R. Schöpke, Greg F. W. Gocal. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. 2018, (7): pp:1547-1552.

Scheller Frieder W , Ulla Wollenberger, Axel Warsinke, Fred Lisdat. Research and development in biosensors. 2001. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 12, Issue 1, Pages 35-40.

Schnekenburger Michael, Mario Dicato, Marc Diederich. Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. 2014. *Biotechnology Advances*. Volume 32, Issue 6, Pages 1123-1132.

Schulze, H., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2002. Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase biosensors and simple solvent extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 268–272

Scott W. Kelley, Mark A. Davis. Antecedents to Customer Expectations for Service Recovery. 1994. *SAGE journals*. Vol 22, Issue 1:526-531.

Sharma Kavita , Harinath Chakrapani. Site-directed delivery of nitric oxide to cancers. *Nitric Oxide*. Volume 43, Pages 8-16.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem.J.* 360, 1–16.

Shen Mi, Da-Ke Zhao, Qin Qiao, Lei Liu, Jun-Ling Wang, Guan-Hua Cao, Tao Li, Zhi-Wei Zhao. Identification of Glutathione S-Transferase (GST) Genes from a Dark Septate Endophytic Fungus (*Exophiala pisciphila*) and Their Expression Patterns under Varied Metals Stress. 2015. *PLOS*. 65: 34-39.

Shiyu Tao, Jing Tian, Rihua Cong, Lili Sun, Yongqian Duanmu, Haibo Dong, Yingdong Ni, Ruqian Zhao Activation of cellular apoptosis in the caecal epithelium is associated with increased oxidative reactions in lactating goats after feeding a high-concentrate diet. 2015. *Experimental Physiology*. 100(3): 278–287.

Shou-Tian Zheng, Jie Zhang, Guo-Yu Yang. Designed Synthesis of POM–Organic Frameworks from {Ni₆PW₉} Building Blocks under Hydrothermal Conditions. 2008. *Angewandte Chemie*. 47(21):3909-3913.

Sies H., Glutathione and its role in cellular functions (1999)

Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, 2011, 11, 539.

Siloto Rodrigo M.P., Randall J. Weselake. Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. 2012. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 1, Issue 3, 181-189.

Simonian A.L, T.A. Goodb S., S. Wang, J.R. Wild. Nanoparticle-based optical biosensors for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides. 2005. *Analytica Chimica Acta*. Volume 534, Issue 1, Pages 69-77.

Singh Virendra, Daeha Joung, Lei Zhai, Soumen Das, Saiful I. Khondaker, Sudipta Seal. Graphene based materials: Past, present and future. 2011. *Mechanical Engineering*. 56(8): 1178-1271.

Skopelitou Katholiki , Abdi W. Mulet, Anastassios C. Papageorgiou, Evangelia Chronopoulou, Nikolaos E. Labrou. Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from *Glycine max* specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. 2015. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1854(2): 166-177.

Skopelitou, K.; Muleta, A. W.; Papageorgiou, A. C.; Chronopoulou, E. G.; Pavli, O.; Fliemetakis, E.; Skaracis, G. N.; Labrou, N. E. Characterization and functional analysis of a recombinant tau class glutathione transferase *GmGSTU2-2* from *Glycine max*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017 94, 802-812.

Stephens, Camilla; Andrade, Raúl J.; Lucena, M. Isabel. Mechanisms of drug-induced liver injury. 2014. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*: 14 - Issue 4 - p 286–292.

Sugata Naoko Yoshizawa-, Ai Ishii, Chika Taniyama, Etsuko Matsui, Ken-ichi Arai, Hisao Masai. A Second Human Dbf4/ASK-related Protein, Drf1/ASKL1, Is Required for Efficient Progression of S and M Phases. 2005. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 13062-13070.

Sun Zhipei, Tawfique Hasan, Felice Torrisi, Daniel Popa, Giulia Privitera, Fengqiu Wang, Francesco Bonaccorso, Denis M. Basko, Andrea C. Ferrari. Graphene Mode-Locked Ultrafast Laser. 2010. *ACS Nano*, 2010, 4 (2), pp 803–810.

Sun, Juanzhen, Dawn W. Flicker, Douglas K. Lilly (2010): Recovery of Three-Dimensional Wind and Temperature Fields from Simulated Single-Doppler Radar Data. *J. Atmos. Sci.*, 48, 876–890.

Sundberg Jan, Christer Larsson. Animal Behaviour. Male coloration as an indicator of parental quality in the yellow hammer, *Emberiza citronella*. Vol. 48, Is. 4, (1994), pp 885-892.

Sundberg John P., Charles O. Elson, Hendrick Bedigian, Edward H. Birkenmeier. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. 1994. Volume 107, Issue 6, Pages 1726–1735.

Sunil Verma, David Miles, Luca Gianni, Ian E. Krop, Manfred Welslau, José Baselga, Mark Pegram, Do-Youn Oh, Véronique Diéras, Ellie Guardino, Liang Fang, Michael W. Lu, Pharm.D., Steven Olsen, Kim Blackwell. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. 2012. 32(2):152-160.

Sweeney Michael O., MD, Anne S. Hellkamp, MS, Kenneth A. Ellenbogen, MD, Arnold J. Greenspon, MD, Roger A. Freedman, MD, Kerry L. Lee, PhD, Gervasio A. Lamas, MD.(2003) Adverse Effect of Ventricular Pacing on Heart Failure and Atrial Fibrillation Among Patients With Normal Baseline QRS Duration in a Clinical Trial of Pacemaker Therapy for Sinus Node Dysfunction. *Int. J. Cancer*. 103, 810-814.

Tattersall Glenn J., Brent J. Sinclair, Philip C. Withers, Peter A. Fields, Frank Seebacher, Christine E. Cooper, Shane K. Maloney. 2012. Coping with Thermal

Challenges: Physiological Adaptations to Environmental Temperatures. Wiley online library. 65:125-131.

Taylor Todd J, Iosif I Vaisman. Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. 2010. BMC Structural Biology10(Suppl 1): S5.

Tee Kang Lan, Tuck Seng Wong. Polishing the craft of genetic diversity creation in directed evolution. 2013. Biotechnology Advances. Volume 31, Issue 8, 1707-1721.

Teles F.R.R., Fonseca L.P., Trends in DNA biosensors, 2008, Talanta 77:606-623

Tesauro Magdala, Mikhail K. Kaban, Walter D. Mooney. Variations of the lithospheric strength and elastic thickness in North America Volume 16, Issue 7. July 2015. Pages 2197–2220.

Tew John G., Jiuhua Wu, Dahui Qin, Shirley Helm, Gregory F. Burton, Andrus K. Szakal. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. 1997. View issue TOC. Volume 156, Issue 1. Pages 39–52.

Thom Russell, Ian Cummins, David P. Dixon, Robert Edwards, David J. Cole, Adrian J. Laphorn. Structure of a Tau Class Glutathione S-Transferase from Wheat Active in Herbicide Detoxification. Biochemistry, 2002, 41 (22), pp 7008–7020.

Thomson Rachel , Alison L. Bigley, John R. Foster, Ian R. Jowsey, Clifford R. Elcombe, Terry C. Orton, John D. Hayes. Tissue-specific Expression and Subcellular Distribution of Murine Glutathione S-transferase Class Kappa. 2004.

Ting Cai, Xumeng Ge Stephen, Y. Park YeboLi. Comparison of Synechocystis sp. PCC6803 and Nannochloropsis salina for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. Bioresource Technology. 2013, 144: 255-260.

Townsend M. Danyelle, Kenneth D.Tew, Haim Tapiero. The importance of glutathione in human disease. 2003. Springer Link. 3-4: 145-155.

Trettnak Wolfgang, Franz Reininger, Ernst Zinterl, Otto S. Wolfbeis. Fiber-optic remote detection of pesticides and related inhibitors of the enzyme acetylcholine esterase. 1993, Sensors and Actuators B: Chemical. Volume 11, Issues 1–3, Pages 87-93

Túlio I.S. Oliveira, Marcela Oliveira, Subramanian Viswanathana M. Fátima Barrosoa, Luísa Barreirosd Olga C. Nunesd José A. Rodrigues, Pedrode Lima-Netob Selma, E. Mazzetto Simone Moraisa Cristina Delerue-Matosa. Molinate quantification in environmental water by a glutathione-S-transferase based biosensor. Talanta. 2013, 106: 249-254.

Turdean, G.L., Popescu, I.C., Oniciu, L., Thevenot, D.R., 2002. Sensitive detection of organophosphorus pesticides using a needle type amperometric acetuylcholinesterase-based bioelectrode. Thiocholine electrochemistry and immobilised enzyme inhibition. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 17 (2), 107–115.

Tyzack Jonathan D, Nicholas Furnham, Ian Sillitoe, Christine M Orenge, Janet M Thornton. Understanding enzyme function evolution from a computational perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, Volume 47, Pages 131-139.

Tzafestas Kyriakos, Maria M. Razalan, Ivan Gyulev, Aslam M. A. Mazari, Bengt Mannervik, Elizabeth L. Rylott, Neil C. Bruce. Expression of a *Drosophila* glutathione transferase in *Arabidopsis* confers the ability to detoxify the environmental pollutant, and explosive, 2,4,6-trinitrotoluene. 2017. Volume 214, Pages 294–303.

Umena Yasufumi , Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen & Nobuo Kamiya. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. 2011. *Nature* 473, 55–60.

Veal EA, Toone WM, Jones N, Morgan BA. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277:35523–31

Velasco-Garcia Maria N. , Toby Mottram. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. 2003. *Biosystems Engineering*. Volume 84, Issue 1, Pages 1-12.

Vello Tatiana P. , Larissa M.B.da Silvaa, Gustavo O. Silva, Davi H.S.de Camargoa,Cátia C.Corrêaa, Carlos C.Bof Bufon. Hybrid organic/inorganic interfaces as reversible label-free platform for direct monitoring of biochemical interactions. 2017. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 87, Pages 209-215.

Verma Neelam, Atul Bhardwaj. Biosensor Technology for Pesticides—A review. 2015. *Biochemistry and Biotechnology*. Volume 175, Issue 6, pp 3093–3119.

Vinayaka C., S. Basheer, M. S. Thakur. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay based biosensor. 2009. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 24, Issue 6, Pages 1615-1620.

Wagner U, Edwards R, Dixon DP: Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 2002, 49:515-532.

Wahlstrand K. Jared, Yu-Hsin Chen, Yu-Hsiang Cheng, Sanjay R. Varma, Howard M. Milchberg. Measurements of the High Field Optical Nonlinearity and Electron Density in Gases: Application to Filamentation Experiments. 2012. *IEEE Journal of Quantum Electronics*. 48: 760-767.

Wang Chang-Lin, David J. Oliver. Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of *agsh2* mutant in fission yeast. 1996. *Plant Molecular Biology*. 31: 1093-1104.

Wang MC, Bohmann D, Jasper H. 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Develop. Cell* 5: 811–16

Yang Q, Liu Y-J, Zeng Q-Y: Biochemical functions of the glutathione transferase supergene family of *Larix kaempferi*. *Plant Physiol Biochem* 2014, 77:99-107.

Yang Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (2010). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochemica Polonica*. 50, 319-336.

Yuan, N. Kaplowitz, Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity, *Mol. Aspects Med.* 30 (2009) 29–41.

Wang Xuan , Linjie Zhi, Klaus Müllen. Transparent, Conductive Graphene Electrodes for Dye-Sensitized Solar Cells. *Max Planck Institute for Polymer Research, Nano Lett.*, 2008, 8 (1), pp 323–327.

Wang Yihui, Tao Tanga, Bin Ninga, Ton J.J.van den Boomb, Bart De Schutterb. Passenger-demands-oriented train scheduling for an urban rail transit network. 2015. *Springer Link*. 60: 1-23.

Wilson S. George, Raeann Gifford. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. .Volume 20, Issue 12, Pages 2388-2403.

Wintrode Patrick L., Kentaro Miyazaki, Frances H. Arnold. Cold Adaptation of a Mesophilic Subtilisin-like Protease by Laboratory Evolution. 2000. *JBC*. 275: 31635-31640.

Wright Thaiesha, Jamie M. tewart, Richard C.Page, Dominik Konkolewicz. Extraction of Thermodynamic Parameters of Protein Unfolding Using Parallelized Differential Scanning Fluorimetry. 2017. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, 8 (3), pp 553–558.

Xiao Han, Zehua Bao, Huimin Zhao. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, 54 (16), pp 4011–4020.

Xu Fei. Numerosity discrimination in infants: Evidence for two systems of representations. 2003. *Cognition*. Volume 89, Issue 1, Pages B15-B25.

Xu Jian-zhong, Wei-guo Zhan. Strategies used for genetically modifying bacterial genome: site-directed mutagenesis, gene inactivation, and gene over-expression. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2016, Volume 17, Issue 2, pp 83–99.

Xu Zhi-Bin, Xiao-Peng Zou, Ni Zhang, Qi-Li Feng, Si-Chun Zheng. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. 2014, (56): pp:654-659.

Yang Gong, Xiao-Ou Shu M.D., Zhi-Xian Ruan B.S., Qiu-Yin Cai M.D., Fan Jin M.D., Yu-Tang Gao M.D., Wei Zheng M.D. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. 2004. 103(1): 52-58.

Yang, G.; Wang, Y.; Xia, D.; Gao, C.; Wang, C.; Yang, C. Overexpression of a GST gene (ThGSTZ1) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species. *PCTOC*, 2014, 117, 99-112.

You Chang-Cheng , Oscar R. Miranda, Basar Gider, Partha S. Ghosh, Ik-Bum Kim, Belma Erdogan, Sai Archana Krovi, Uwe H. F. Bunz, Vincent M. Rotello. Detection and identification of proteins using nanoparticle–fluorescent polymer ‘chemical nose’ sensors. 2007. *Nature Nanotechnology* volume2, pages318–323.

You X. P., G. B. Hobbs, W. A. Coles, R. N. Manchester, J. L. Han. An Improved Solar Wind Electron Density Model for Pulsar Timing. 2007. *The Astrophysical Journal*. 15(25):456-466.

Yu K.S.H. , K.W.Y. Yau, Y. S. Wong, N. F. Y. Tam. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. 2005. *Marine Pollution Bulletin*

Yu Pan, Sabine Neuss, Annika Leifert, Monika Fischler, Fei Wen, Ulrich Simon, Günter Schmid, Wolfgang Brandau, Willi Jahnen-Dechent. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. 2007. Volume 3, Issue 11. Pages 1941–1949.

Zeinab K. Hassan, Mai A. Elobeid, Promy Virk, Sawsan A. Omer, Maha ElAmin, Maha H. Daghestani, and Ebtisam M. AlOlayan. A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model. 2012, 124-128.

Zhang L.L., J. X. Liub, X. Q. Fang, G. Q. Nieb. Effects of surface piezoelectricity and nonlocal scale on wave propagation in piezoelectric nanoplates. 2014. *European Journal of Mechanics - A/Solids*. Volume 46, Pages 22-29.

Zhang Wenyi, Cuijuan Niu, Yukun Liu, Bojian Chen. Glutathione redox balance in hibernating Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* hatchlings. 2017. Elsevier. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 207: 9-14.6(3):137-145

Zhang, S., Zhao, H., John, R., 2001. A theoretical model for immobilized enzyme inhibition biosensors. *Electroanalysis* 13, 1528–1534.

Zhang, Y., Muench, S.B., Schulze, H., Perz, R., Yang, B., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2005. Disposable biosensor test for organophosphate and carbamate insecticides in milk. *Agric. Food Chem*

Zoi O.G., Thireou T.N., Rinotas V.E., Tsoungas P.G., Eliopoulos E.E., Douni E.K., Labrou N.E. and Clonis Y.D. Designer xanthone: an inhibitor scaffold for MDR-involved human glutathione transferase isoenzyme A1-1. *J. Biomol. Screen*. 18 (2013) 1092-1102.

Zompra, A.; Georgakis, N.; Pappa, E.; Thireou, T.; Eliopoulos, E.; Labrou, N.; Cordopatis, P.; Clonis, Y. Glutathione analogues as substrates or inhibitors that discriminate between allozymes of the MDR-involved human glutathione transferase P1-1. *Pept Sci*, 2016, 106, 330-339.

