

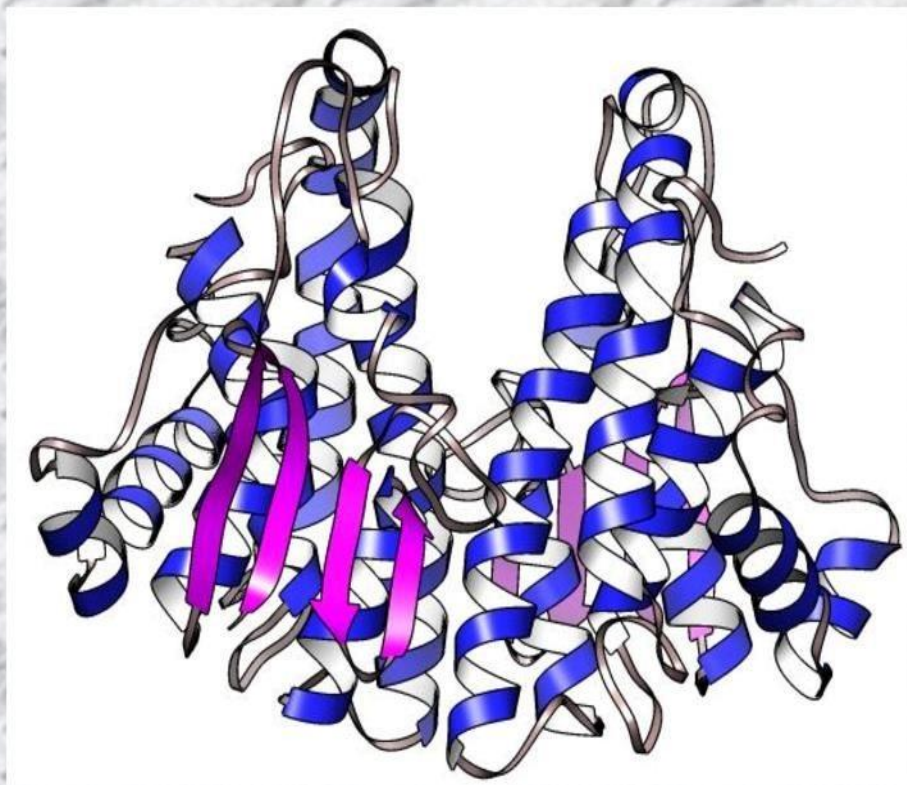


Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*“Πρωτεϊνική μηχανική και μοριακή μελέτη του ενζύμου
τρανσφεραση της γλουταθειόνης”*



ΠΕΡΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΦΕΡΕΝΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΛΑΜΠΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2018

*“Πρωτεϊνική μηχανική και μοριακή μελέτη του ενζύμου
τρανσφεράση της γλουταθειόνης”*

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

Η ανάθεση της διδακτορικής διατριβής (“Πρωτεϊνική μηχανική και μοριακή μελέτη του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης”) έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 6^η/15-01-2014). Ο ορισμός της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 7^η/24-01-2014).

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας,
Γ.Π.Α. (Επιβλέπων Καθηγητής)

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας,
Γ.Π.Α.

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο
Μοριακής Βιολογίας, Γ.Π.Α.

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας,
Γ.Π.Α. (Επιβλέπων Καθηγητής)

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας,
Γ.Π.Α.

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο
Μοριακής Βιολογίας, Γ.Π.Α.

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής, Εργαστήριο Γεωργικής
Φαρμακολογίας, Γ.Π.Α.

Παναγιώτης Μαδέσης, Ερευνητής Β, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων
Βιοεπιστημών (ΙΝ.Ε.Β), Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής
Ανάπτυξης

Δημήτριος Βλαχάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής,
Γ.Π.Α.

Ελένη Τάνη, Λέκτορας, Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και
Γεωργικού Πειραματισμού, Γ.Π.Α.

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής έτυχε χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) σε συναργασία με την εταιρεία Siemens.



Δημοσιεύσεις

- 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 (2014). Plant glutathione transferases: structure, antioxidant catalytic function and in planta protective role in biotic and abiotic stress, *Current Chemical Biology*, 8, 58-75.
- F. Perperopoulou, F.S Ataya, D. Fouad, A. Malik, H.M. Saeed, N.E. Labrou (2016). Biochemical characterization of the detoxifying enzyme glutathione transferase P1-1 from the camel *Camelus Dromedarius*. *Cell Biochem. Biophys.* 74(4): 459-472.
- F. Perperopoulou, F. Pouliou, N. E. Labrou (2017). Comparative analysis of two stress-inducible tau class glutathione transferases from *Glycine max* revealed significant catalytic and structural diversification. *Protein & Peptide Letters*, 24(10): 1-14.
- F. Perperopoulou, F. Pouliou, N. E. Labrou (2017). Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases. *Crit Rev in Biotech*, DOI: 10.1080/07388551.2017.1375890
- 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.
- 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.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

- 8th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment & 14th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Ιωάννινα 18-21 Σεπτεμβρίου 2014. Τίτλος ανακοίνωσης: Development of novel catalytic bioscavengers for herbicide detoxification.
- 6th European Bioremediation Conference (EBC-VI), Πλατανιάς Κρήτης 29/6-2/7/2015, Τίτλος ανακοίνωσης: Evaluation of catalytic efficiency and substrate promiscuity in glutathione transferases from photosynthetic organisms for bioremediation.
- 2nd International Conference on Enzymology and Molecular Biology, Ρώμη 20-21 Μαρτίου 2017. Τίτλος ανακοίνωσης: Molecular characterization of glutathione transferase M1-1 from the *Camelus dromedarius*.
- 4th European Chemistry Congress, Βαρκελώνη 11-13 Μαΐου 2017. Τίτλος ανακοίνωσης: Characterization of the Pesticide Detoxifying Enzyme *CdGSTM1-1* by Kinetic Analysis and Differential Scanning Fluorimetry.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ειπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου.

Η συγκεκριμένη διατριβή είναι αποτέλεσμα ενός ταξιδιού που διήρκησε τέσσερα χρόνια, γεμίζοντας με με πολύτιμες εμπειρίες και ωριμάζοντας με ως επιστήμονα και ως άνθρωπο. Σε όλες τις χαρούμενες και σε κάποιες περιπτώσεις, δύσκολες στιγμές αυτού του ταξιδιού είχα μαζί μου αρκετούς ανθρώπους να με στηρίζουν και να με καθοδηγούν. Χωρίς αυτούς, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δε θα ήταν εφικτό, γι' αυτό και θα ήθελα να τους αναφέρω παρακάτω ως ελάχιστο δείγμα της ευγνωμοσύνης μου.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικόλαο Λάμπρου για τη συνεχή υποστήριξη, την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ηθικό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής και συγγραφικής διαδικασίας. Με υπομονή διαφώτιζε τις απορίες μου και χάρη στην αποφασιστική του βοήθεια, ξεπερνούσα τα προβλήματα που προέκυπταν στη διάρκεια των πειραμάτων. Είναι και θα παραμείνει για εμένα πρότυπο επιστήμονα και ανθρώπου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ιωάννη Κλώνη που με καθοδηγούσε να ξεπερνάω τους σιοπέλους μόνη μου,

δείχνοντας μου την πορεία προς την εύρεση της λύσης και ποτέ μία έτοιμη απάντηση.

Αισθάνομαι επίσης ιδιαίτερα ευγνώμων προς τον καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη που με τίμησε με τη συμμετοχή του στην συμβουλευτική επιτροπή για την αξιολόγηση της διατριβής μου και που προσέφερε σημαντική συνεισφορά στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τις θερμές μου ευχαριστίες και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την τιμή που μου έκαναν με την συμμετοχή τους στην εξέταση της διατριβής μου.

Δεν θα ήταν δυνατό να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κα Ευαγγελία Παππά ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου, η οποία με συμβούλευε συνεχώς με την επιστημονική της κατάρτιση και το ζεστό της χαμόγελο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη μου Δρ. Χρονοπούλου Εύη για την καθοριστική της στήριξη στην ομαλή διεξαγωγή και αποτελεσματικότητα των καθημερινών πειραματικών προσπαθειών μου. Εξαιρετικά πολύτιμη ήταν για εμένα και η ψυχολογική υποστήριξη και αναπτέρωση που δέχτηκα από τα παιδιά του εργαστηρίου, τα οποία με τις συμβουλές και τη βοήθεια τους έκαναν την καθημερινότητά μου εκεί πολύ ευχάριστη και εποικοδομητική.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω με συγκίνηση τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους δικούς μου ανθρώπους και ιδιαίτερα στην οικογένεια μου και τους φίλους μου που παρέμειναν δίπλα μου

με κατανόηση και υπομονή από την αρχή του ταξιδιού έως το τέλος του. Η γνώση ότι με καταλαβαίνουν και με στηρίζουν, με όπλισε με τη δύναμη και την αυτοπεποίθηση που είναι απαραίτητες για την πραγμάτωση του δύσκολου αυτού έργου.

Την τελική ευχαριστεία θα ήθελα να την εκφράσω στην φίλη και συνάδελφο μου Φωτεινή Πούλιου, την οποία αγαπώ ως άνθρωπο και εκτιμώ ως επιστήμονα. Είναι για μένα εξαιρετική τύχη να συνεργάζομαι μαζί της όλα αυτά τα χρόνια, καθώς η αλληλοβοήθεια και η αλληλοκατανόηση που μοιραζόμαστε έχουν εξαιρετική επίδραση στην προσωπική και επιστημονική εξέλιξη και ωρίμανσή μου, καρπός των οποίων είναι η παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

| | |
|-------------------|--|
| AITC | Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας |
| APS | Υπερθειϊκό αμμώνιο |
| BDNB | 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο |
| BSA | Αλβουμίνη από ορό μόσχου |
| BSP | Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη |
| BES-GSH | 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθερα-GSH-sepharose-CL6B |
| CDNB | 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο |
| CuOOH | Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου |
| EDTA | Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ |
| FDNB | 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο |
| GSH | Γλουταθειόνη |
| GST | Τρανσφεράση της γλουταθειόνης |
| GSSG | Οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης |
| HED | 2,2-διθειοδιαιθανόλη |
| 4HNE | 4-υδρόξυ-2,3-τρανς-ενενάλη |
| IC50 | Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50 % αναστολή |
| IDNB | 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο |
| IPTG | Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο |
| K _m | Σταθερά Michaelis-Menten |
| K _i | Σταθερά αναστολής |
| NADP ⁺ | Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο |
| NADPH | Ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο |
| NBD-Cl | 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο |
| PAGE | Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου |
| PCR | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης |
| PEITC | Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας |
| pH | - log [H ⁺] |
| PNBC | π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο |
| rpm | Στροφές ανά λεπτό |
| SDS | Δωδεκανοθειϊκό νάτριο |
| TEMED | N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη |
| Tert-BuOOH | τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο |

Περίληψη

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια σημαντική υπεροικογένεια ενζύμων και υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς (προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς) ως ισοένζυμα διαφορετικής εκλεκτικότητας. Πρόκειται για πολυλειτουργικά ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου, αδρανοποιώντας ενδογενείς ή εξωγενείς τοξικές ενώσεις, μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικού δεσμού με την γλουταθειόνη. Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται είναι λιγότερο τοξικά και πιο υδατοδιαλυτά, με αποτέλεσμα να απεκρίνονται πιο εύκολα από τον οργανισμό. Ωστόσο, οι ρόλοι τους δε περιορίζονται μόνο στην αποτοξίνωση, αφού συμβάλλουν και σε άλλες λειτουργίες, όπως η μεταφορά και αποθήκευση διάφορων υδρόφοβων μορίων. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορων ειδών καταπονήσεις, όπως καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία, καθώς επίσης βιοτικό και αβιοτικό στρες, κ.α. Τα συγκεκριμένα ένζυμα βρίσκονται στο επίκεντρο της έρευνας, καθώς βρίσκουν πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως η βιοτεχνολογία, η ιατρική, η γεωπονία κ.α.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής, σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν αρχέγονες μορφές του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση GST αλληλουχιών από *Glycine max*, *Agrobacterium tumefaciens* καθώς και GSTs διάφορων οργανισμών, με σκοπό να γίνει *in silico* σχεδιασμός αρχέγονων αλληλουχιών με τη χρήση του προγράμματος FastML. Κατόπιν της φυλογενετικής μελέτης, σχεδιάστηκαν τέσσερα αρχέγονα ένζυμα σύμφωνα με τα αποτελέσματα του *in silico* σχεδιασμού (N1 Ancient, N10 *Atu*GST, N20 Ancient & N1 Tau), προκειμένου να μελετηθούν τα κινητικά και δομικά τους χαρακτηριστικά. Αφού πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση σε κύτταρα *E. coli* και καθαρίστηκαν με τη μέθοδο χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές (K_m , k_{cat}) για τα υποστρώματα 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) και γλουταθειόνη (GSH), προσδιορίστηκε η ειδική τους δραστηριότητα για δεκαεννιά πιθανά υποστρώματα και, τέλος, μελετήθηκε η δομική τους σταθερότητα. Όσον αφορά στα κινητικά χαρακτηριστικά των συνθετικών αρχέγονων ενζύμων, το N1 Ancient και ως προς τα δυο υποστρώματα και το N10 *Atu*GST ως προς το BDNB

εμφάνισαν αλλοστερισμό, ενώ τα υπόλοιπα ένζυμα φάνηκε να υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten. Αναφορικά με τα πιθανά υποστρώματα, βάσει των αποτελεσμάτων, δεν φάνηκε κανένα από τα υπό μελέτη ένζυμα να εμφανίζει ευρεία εκλεκτικότητα. Τέλος, η μελέτη της θερμοσταθερότητας έδειξε ότι δεν είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερά ένζυμα, παρόλο που πρόκειται για αρχέγονες μορφές του ενζύμου. Επίσης, μελετήθηκε η αλληλουχία του οργανισμού *Thermosynechococcus elongates*, ενός θερμόφιλου μονοκύτταρου κυανοβακτηρίου. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε έκφραση και καθαρισμός με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές (K_m , k_{cat}) για τα υποστρώματα 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) και γλουταθειόνη (GSH), προσδιορίστηκε η ειδική δραστικότητά του για δεκαεννιά υποστρώματα και υπολογίστηκε η τιμή T_m . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο *TeGST* δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αρχέγονα ένζυμα που μελετήθηκαν, όσον αφορά στα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά τους.

Το επόμενο κεφάλαιο της εργασίας αφορά τη μελέτη GSTs της *tau* τάξης από φυτικούς οργανισμούς και πιο συγκεκριμένα από φυτά σόγιας (*Glycine max*) και φασολιού (*Phaseolus vulgaris*), καθώς επίσης και μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου. Αρχικά, μελετήθηκε το ισοένζυμο GSTU2-2 από φασόλι καθώς επίσης και μια βιβλιοθήκη δέκα μεταλλαγμένων μορφών του, οι οποίες είχαν δημιουργηθεί με την τεχνική της *in vitro* κατευθυνόμενης εξέλιξης (DNA shuffling). Ύστερα από σάρωση της βιβλιοθήκης, επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω δυο ισοένζυμα (*PnGSTU2-2.1* και *PnGSTU2-2.10*), βάσει της υψηλής τους ενζυμικής δραστικότητας. Αφού πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση σε κύτταρα *E. coli* και καθαρίστηκαν με τη μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση τους με τριάντα οκτώ διαφορετικά φυτοφάρμακα για την εύρεση πιθανών αναστολέων, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές (K_m , k_{cat}) για τα υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) και γλουταθειόνη (GSH) και, τέλος, μελετήθηκαν για τη θερμική τους σταθερότητα. Όσον αφορά στις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το ισοένζυμο *PnGSTU2-2.1* αναστέλλεται σημαντικά από την ένωση Teflubenzuron. Έτσι, υποβλήθηκε σε περαιτέρω μελέτη, προκειμένου να προσδιοριστεί η τιμή IC_{50} , ο τύπος αναστολής καθώς επίσης και η σταθερά αναστολής K_i . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πρόκειται για έναν ισχυρό αναστολέα με τιμή IC_{50} $38,8 \pm 4,8 \mu M$. Ο τύπος αναστολής που επιφέρει η συγκεκριμένη ένωση

στο υπό μελέτη ένζυμο ήταν μερικώς μικτή και ως προς τα δυο υποστρώματα που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, οι σταθερές αναστολής ως προς το CDNB ήταν $K_i = 0,02 \pm 0,0008 \mu\text{M}$ και $K_i' = 0,059 \pm 0,002 \mu\text{M}$, ενώ ως προς GSH ήταν $K_i = 0,023 \pm 0,007 \mu\text{M}$ και $K_i' = 0,00014 \pm 0,00008 \mu\text{M}$.

Η μελέτη των κινητικών χαρακτηριστικών τους έδειξε ότι και τα τρία ισοένζυμα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς την GSH, ενώ ως προς το CDNB έχουν σχετικά υψηλές τιμές K_m . Επίσης, μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα των ισοενζύμων *PvGSTU2-2* και *PvGSTU2-2.1*, σύμφωνα με την οποία ο άγριος τύπος (*PvGSTU2-2*) είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερός συγκριτικά με την μεταλλαγμένη μορφή, αλλά και γενικά σε σύγκριση με άλλα φυτικά ισοένζυμα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επίλυση και ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της μεταλλαγμένης μορφής *PvGSTU2-2.1* με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι το ένζυμο δημιουργεί οκταμερή.

Στο πλαίσιο του ίδιου κεφαλαίου, μελετήθηκε εκτενώς και το ένζυμο GSTU8-8 από *Glycine max*. Οι κινητικές παράμετροι έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει πολύ υψηλή συγγένεια ως προς τα δυο υποστρώματα που μελετήθηκαν. Επίσης, μελετήθηκε η εξειδίκευση του ως προς άλλα πιθανά υποστρώματα και φάνηκε ότι πρόκειται για ένα ένζυμο με ευρεία εκλεκτικότητα, αφού από τα δεκαεννιά υποστρώματα που μελετήθηκαν φάνηκε ότι καταλύονται τα δώδεκα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη για να εξακριβωθεί ο ρόλος του σε μη καταλυτικές λειτουργίες, όπως είναι η μεταφορά ή η αποθήκευση διάφορων υδρόφοβων μορίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο είναι ικανό να δεσμεύει τέτοιες ενώσεις. Τέλος, η μελέτη της θερμοσταθερότητας υπέδειξε ότι πρόκειται για ένα από τα πιο θερμοσταθερά ένζυμα της τάξης *tau*.

Ο τελευταίος άξονας της διατριβής είχε ως βασικό στόχο τη μελέτη GSTs από έναν ζωικό οργανισμό, ο οποίος διαβιεί σε εξαιρετικά αντίξοες συνθήκες, την καμήλα (*Camelus dromedarius*). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δυο ένζυμα από δυο διαφορετικές τάξεις, το *CdGSTP1-1* και το *CdGSTM1-1*, και χαρακτηρίστηκαν τα κινητικά και δομικά τους χαρακτηριστικά, η θερμοσταθερότητά τους, καθώς και η εκλεκτικότητά τους έναντι διάφορων υποστρωμάτων και διάφορων

φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Αναφορικά με τα κινητικά τους χαρακτηριστικά, και τα δυο ένζυμα φάνηκε να υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten, με το ένζυμο της *mu* τάξης να εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια ως προς τα δυο υποστρώματα. Σχετικά με την θερμοσταθερότητα, δε φάνηκε να είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικά, παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες στις οποίες ζει ο συγκεκριμένος οργανισμός είναι ιδιαίτερα αντίξοες. Η μελέτη ως προς τις μη καταλυτικές τους λειτουργίες έδειξε ότι δεν εμφάνισαν ιδιαίτερη ικανότητα δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων, που δεν λειτουργούν ως υποστρώματα. Όσον αφορά στην εξειδίκευση τους έναντι διάφορων υποστρωμάτων, φάνηκε και τα δυο ένζυμα να εμφανίζουν ευρεία εκλεκτικότητα. Επιπλέον, η μελέτη ποικιλίας φυτοφαρμάκων ως πιθανών αναστολέων έδειξε ότι το *CdGSTM1-1* αναστέλλεται πλήρως από το μυκητοκτόνο *Zoxium zoxamide*. Έτσι, μελετήθηκε περαιτέρω και προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} , ο τύπος αναστολής καθώς επίσης και οι σταθερές αναστολής. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά, αφού η τιμή IC_{50} ήταν $1,49 \pm 0,068 \mu M$. Ο τύπος αναστολής ως προς το CDNB ήταν καθαρά συναγωνιστικός με την σταθερά αναστολής μόλις $0,96 \pm 0,29 \mu M$, ενώ ως προς την GSH ήταν μερικώς μικτός με $K_i = 0,074 \pm 0,012 \mu M$ και $K_i' = 0,018 \pm 0,0026 \mu M$. Τέλος, μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου *CdGSTM1-1* ύστερα από επίλυση και ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει την κλασική δομή των GSTs, με μόνη διαφορά ότι σχηματίζει τετραμερή.

Ύστερα από την παραπάνω μελέτη των συγκεκριμένων ενζύμων από διαφορετικές τάξεις και διαφορετικούς οργανισμούς, επιλέχθηκε το ισοένζυμο με τα πιο επιθυμητά χαρακτηριστικά (κινητικές παράμετροι, θερμοσταθερότητα, εξειδικευμένη αναστολή), προκειμένου να κατασκευαστεί ένας ενζυμικός βιοαισθητήρας, ικανός να ανιχνεύει τη συγκεκριμένη φυτοπροστατευτική ένωση από περιβαλλοντικά δείγματα και ειδικότερα από δείγματα νερού. Έτσι, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που είχαν συλλεχθεί, επιλέχθηκε η μεταλλαγμένη μορφή *PnGSTU2-2.1*, η οποία εμφάνισε εξαιρετική θερμοσταθερότητα και υψηλή αναστολή ως προς το Teflubenzuron, να ακινητοποιηθεί με γλουταραλδεϋδη. Έπειτα από την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη για την αξιολόγηση του βιοαισθητήρα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά της ακινητοποιημένης μορφής, η τιμή IC_{50} , η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, η

ικανότητα ανίχνευσης της ένωσης σε δείγματα νερού και ο χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τιμή IC50 ήταν $26,4 \pm 2,5$ nM. Η επαναληψιμότητα ήταν σε πολύ καλά επίπεδα (με σφάλμα μόλις 0,000008) και ο βιοαισθητήρας ήταν ικανός να ανιχνεύει τη συγκεκριμένη ένωση τόσο σε δείγματα νερού βρύσης αλλά και εμφιαλωμένου νερού σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (3-75 nM).

Abstract

GSTs constitute an important enzyme superfamily and are found in almost all the organisms (prokaryotic and eukaryotic) as isoenzymes of different selectivity. They are multifunctional enzymes, that are involved in the cell detoxification mechanism by inactivating endogenous or exogenous toxic compounds, creating a covalent bond with glutathione (GSH). The conjugation reactions result in producing less toxic and more water soluble derivatives, that can be easily eliminated from the organism. However, their roles are not limited in detoxification, as they also contribute to other functions, such as the transport and storage of various hydrophobic molecules. In addition, they play a crucial role in the protection of cells from a wide range of stress conditions, such as heavy metals, UV radiation, as well as biotic and abiotic stress. The considerable interest of these enzymes is justified, due to their applications in various fields, such as biotechnology, medicine, agriculture, etc.

In the first part of the dissertation, ancestral GSTs were designed and studied. In particular, phylogenetic analysis of GST sequences from *Glycine max*, *Agrobacterium tumefaciens*, as well as GSTs of various organisms was performed, in order to predict ancestral sequences using FastML program. Following phylogenetic analysis, four ancestral enzymes were designed (N1 Ancient, N10 *Atu*GST, N20 Ancient and N1 Tau). The genes were synthesized, cloned, expressed in *E. coli* and purified using ion exchange chromatography. The enzymes were characterized using steady-state kinetics analysis. The kinetic parameters (K_m , k_{cat}) towards 1-bromo-2,4-dinitrobenzene (BDNB) and GSH were determined. In addition, their substrate specificity towards nineteen potential substrates was investigated and finally, their structural stability was studied. The results showed that the ancestral enzymes display restricted substrate specificity. Thermostability analysis suggested that they display moderate thermostability. Along with this study, a GST isoenzyme from *Thermosynechococcus elongatus*, a thermophilic monocyte cyanobacteria, was also cloned, expressed in *E. coli* and purified. The results showed that *Te*GST exhibits comparable kinetic and structural properties to that of the ancient enzymes.

In the next part of the thesis, the catalytic diversity of GST isoenzymes from different plants was investigated. In particular, the isoenzyme *Gm*GSTU8-8 from *Glycine max*,

the isoenzyme PvGSTU2-2 from *Phaseolus vulgaris*, as well as a library of ten mutants of PvGSTU2-2, created with *in vitro* DNA shuffling, were studied. Following activity screening of the library, two isoenzymes (PvGSTU2-2.1 and PvGSTU2-2.10) that displayed high catalytic activity were selected for further characterization. The enzymes were cloned, expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Steady-state kinetic analysis was performed to determine the kinetic parameters (K_m , k_{cat}) towards a range of different electrophile substrates. The binding and the structural features of these enzymes were also investigated. The results showed that the isoenzyme PvGSTU2-2.1 display high sensitive towards teflubenzuron (IC_{50} 38.8 ± 4 μM). Kinetic inhibition analysis showed that teflubenzuron displayed mixed type inhibition. Furthermore, the mutant PvGSTU2-2.1 was subjected to structural determination by X-ray crystallography and the results showed that the enzyme forms octamers. Comparative structural analysis showed that the enzyme share the same overall fold and domain organization, however major variations were identified in helices H4 and H9 that affect xenobiotic substrate recognition and catalytic mechanism.

In the next part of the thesis, we aim at studying the catalytic, structural and binding features of GSTs from a mammal that lives in extremely harsh conditions, such as *Camelus dromedarius*. Two isoenzymes from different GST classes, CdGSTP1-1 and CdGSTM1-1, were expressed in *E. coli* and purified. The results showed that both isoenzymes appeared to obey the Michaelis-Menten kinetics, with the *mu* class GST displaying higher affinity towards both substrates. Both enzymes display wide substrate specificity and did not appear to be particular thermostable. The study of the ligandin function of CdGSTP1-1 and CdGSTM1-1 indicated that both enzymes exhibit a rather reduced ability to bind xenobiotic compounds in a non-substrate manner. However, CdGSTM1-1 appears to be very sensitive towards the fungicide Zoxium zoxamide (IC_{50} 1.49 ± 0.068 μM). Kinetics inhibition analysis showed that, using CDNB as a variable substrate, Zoxium zoxamide displayed purely competitive inhibition (K_i 0.96 ± 0.29 μM), whereas when using GSH as a variable substrate, Zoxium zoxamide showed mixed-type inhibition (K_i 0.074 ± 0.012 μM and K_i' 0.018 ± 0.0026 μM). The structure of CdGSTM1-1 was determined by X-ray crystallography. The results showed that the enzyme displays the characteristic GST

fold. The amino acids that are involved in substrate binding and catalysis are highly conserved among mammalian Mu class GST isoenzymes.

Following the study of the catalytic diversity of GSTs, from various classes and organisms, the isoenzyme *PvGSTU2-2.1* with the most desirable characteristics (kinetic parameters, thermostability, inhibition sensitivity) was selected for the development of an enzyme biosensor capable to detect teflubenzuron in environmental samples (water samples). The enzyme *PvGSTU2-2.1*, which exhibited excellent thermostability and high inhibition towards teflubenzuron, was tethered by cross-linking with glutaraldehyde in the presence of BSA. Following the successful immobilization of the enzyme, a further study was conducted in order to evaluate the biosensor. The kinetic characteristics of the immobilized enzyme, as well as its ability to detect teflubenzuron in water samples and the lifetime of the biosensor were evaluated. The results showed that the immobilized enzyme display high affinity towards teflubenzuron ($IC_{50} 26.4 \pm 2.5$ nM). The biosensor was capable to detect teflubenzuron in both drinking water and mineral water samples within the linear concentration range 3-75 nM.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 | 1 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1.1 ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) | 2 |
| 1.2 ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗ (Trx) | 6 |
| 1.3 ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)..... | 7 |
| 1.3.1 Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs | 9 |
| 1.3.2 Κυτταροπλασματικές GSTs | 11 |
| 1.3.2.1 Τάξεις | 11 |
| 1.3.2.2 Δομή..... | 12 |
| 1.3.3 Καταλυτικός μηχανισμός των GSTs..... | 18 |
| 1.3.3.1 Ενζυμική αποτοξίνωση ξενοβιοτικών μέσω συμπλοκοποίησης με την GSH..... | 24 |
| 1.3.3.2 Οξειδωτική καταπόνηση και ο ρόλος των GSTs..... | 26 |
| 1.3.3.3 Αντιδράσεις ισομερίωσης | 28 |
| 1.3.3.4 Γλουταθειονυλίωση | 30 |
| 1.3.3.5 Δράση αναγωγής και θειομεταφοράς | 31 |
| 1.3.3.6 Θεραπευτική σήμανση σε ασθένειες | 32 |
| 1.3.4 Μη καταλυτικός ρόλος των GSTs | 34 |
| 1.3.4.1 Οι GSTs και ο ρόλος τους ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης..... | 34 |
| 1.3.5 Κινητική αντίδρασης των ενζύμων..... | 35 |
| 1.3.6 Αναστολή των ενζύμων | 40 |
| 1.3.6.1 Συναγωνιστική αναστολή | 41 |
| 1.3.6.2 Μικτή αναστολή | 42 |
| 1.3.6.3 Ανταγωνιστική αναστολή | 45 |
| 1.3.7 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις και GSTs | 47 |
| 1.3.8 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs | 48 |
| 1.3.8.1 GSTs και Γεωπονία..... | 48 |
| 1.3.8.2 GSTs και Περιβάλλον..... | 48 |
| 1.3.8.3 GSTs και Βιοαισθητήρες | 49 |
| 1.3.8.4 GSTs και Ιατρική | 51 |
| 1.3.8.5 GSTs και Νανοβιοτεχνολογία..... | 53 |
| 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ | 53 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 | 55 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 55 |
| 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ..... | 56 |
| 2.1.1 Βιολογικά υλικά..... | 56 |
| 2.1.2 Ένζυμα και πρωτεΐνες..... | 56 |
| 2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια και υποστρώματα | 56 |
| 2.1.4 Πλαστικά αναλώσιμα..... | 59 |
| 2.1.5 Όργανα..... | 59 |
| 2.1.6 Προγράμματα Η/Υ | 60 |
| 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ | 61 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών και εκφραστικών βακτηριακών κυττάρων DH5a, 10G Hi-Control και BL21(DE3)..... | 61 |
| 2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης..... | 62 |
| 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αгарόζης..... | 63 |
| 2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 64 |
| 2.2.5 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA και μετάφραση | 65 |
| 2.2.6 Υποκλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® ... | 66 |
| 2.2.7 Υποκλωνοποίηση γονιδίων με τη χρήση της τεχνολογίας EXPRESSO™ .. | 67 |
| 2.2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών και εκφραστικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA | 68 |
| 2.2.9 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου GST σε στελέχη κυττάρων E. coli..... | 69 |
| 2.2.10 Λύση κυττάρων και παραλαβή ενζυμικού εκχυλίσματος..... | 69 |
| 2.2.11 Διαύδιση..... | 70 |
| 2.2.12 Σύνθεση του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθερας-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH) | 70 |
| 2.2.13 Καθαρισμός των ισοενζύμων GST σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας | 71 |
| 2.2.14 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου GST | 72 |
| 2.2.15 Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας GST | 73 |
| 2.2.16 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο κατά Bradford | 74 |
| 2.2.17 Αξιολόγηση ενζυμικής καθαρότητας..... | 76 |
| 2.2.17.1 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA) | 76 |
| 2.2.17.2 Υπολογισμός ανάκτησης ενζύμου (%) | 76 |
| 2.2.17.3 Καθαρισμός που επετεύχθη (φορές)..... | 76 |
| 2.2.18 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου..... | 76 |
| 2.2.18.1 Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου..... | 77 |
| 2.2.18.2 Προετοιμασία δειγμάτων | 78 |
| 2.2.18.3 Βαφή με τη χρωστική COOMASSIE BLUE R-250 | 79 |
| 2.2.19 Φωτομετρικός προσδιορισμός πιθανών υποστρωμάτων GSTs | 79 |
| 2.2.19.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα παράγωγα νιτροβενζολίου BDNB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl | 79 |
| 2.2.19.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου | 79 |
| 2.2.19.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο 2-2-διθειοδιαιθανόλη (HED)..... | 80 |
| 2.2.19.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το διϋδροασκορβικό οξύ (DHA) | 80 |
| 2.2.19.5 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια εθακρινικό οξύ (EA) και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη | 80 |
| 2.2.19.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) και trans-2-ενεάλη (HNE)..... | 81 |
| 2.2.19.7 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC) | 81 |
| 2.2.19.8 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το Fluorodifen..... | 81 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.19.9 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σουλφανιλαμίδη | 82 |
| 2.2.20 Κινητική μελέτη του ενζύμου έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης | 84 |
| 2.2.21 Κινητική μελέτη του ενζύμου έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης | 84 |
| 2.2.22 Σάρωση βιβλιοθήκης ενώσεων για την διαπίστωση δράσης αναστολέα του ενζύμου..... | 85 |
| 2.2.23 Υπολογισμός της συγκέντρωσης IC50 | 85 |
| 2.2.24 Κινητική μελέτη αναστολής | 86 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 | 87 |
| ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ GSTs..... | 87 |
| 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 88 |
| 3.1.1 Φυλογενετική ανάλυση..... | 88 |
| 3.1.2 Αναβίωση Αρχέγονων Αλληλουχιών | 89 |
| 3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 91 |
| 3.2.1 Βιολογικά υλικά..... | 91 |
| 3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση GST αλληλουχιών | 91 |
| 3.2.3 Ανάλυση αρχέγονων αλληλουχιών με το πρόγραμμα FASTML | 91 |
| 3.2.3.1 Μεθοδολογία..... | 92 |
| 3.2.4 Σχεδιασμός των αρχέγονων αλληλουχιών | 93 |
| 3.2.5 Υποκλωνοποίηση των αρχέγονων αλληλουχιών σε πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® | 94 |
| 3.2.6 Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων σε στελέχη κυττάρων E. coli | 95 |
| 3.2.7 Καθαρισμός των ενζύμων | 95 |
| 3.2.7.1 Καθαρισμός μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας έχοντας ως προσροφητή Ni-NDA | 95 |
| 3.2.7.2 Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας..... | 96 |
| 3.2.7.3 Καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιώντας κατιοντικό προσροφητή (DEAE-Sepharose)..... | 96 |
| 3.2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο κατά Bradford και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας των αρχέγονων ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα..... | 97 |
| 3.2.9 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα BDNB και GSH | 98 |
| 3.2.10 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων | 99 |
| 3.2.11 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης για το ένζυμο N1 Ancient | 99 |
| 3.2.12 Μελέτη της επίδρασης του pH στην ταχύτητα της αντίδρασης για τα ένζυμα N1 Ancient και N1 Tau | 99 |
| 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 100 |
| 3.3.1 Φυλογενετική ανάλυση και βιοϋπολογιστικός σχεδιασμός αρχέγονων αλληλουχιών | 100 |
| 3.3.2 Ενίσχυση των αρχέγονων αλληλουχιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.3 Μετασηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> και ετερόλογος έκφραση των αρχέγονων ενζύμων | 108 |
| 3.3.4 Καθαρισμός των συνθετικών αρχέγονων ενζύμων..... | 109 |
| 3.3.4.1 ThermoGST (GST από <i>Thermosynechococcus elongatus</i>)..... | 109 |
| 3.3.4.2 N1 Ancient..... | 110 |
| 3.3.4.3 N10 AtuGST | 111 |
| 3.3.4.4 N20 Ancient..... | 112 |
| 3.3.4.5 N1 Tau | 113 |
| 3.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας των αρχέγονων ενζύμων ως προς πιθανά υποστρώματα | 115 |
| 3.3.6 Κινητική ανάλυση των αρχέγονων ενζύμων ως προς τα υποστρώματα BDNB και GSH | 117 |
| 3.3.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων..... | 120 |
| 3.3.8 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας για το ένζυμο N1 Ancient..... | 122 |
| 3.3.9 Μελέτη της επίδρασης του pH για τα ένζυμα N1 Ancient και N1 Tau.... | 122 |
| 3.3.10 Βιοϋπολογιστική μελέτη της δομής των αρχέγονων ενζύμων..... | 123 |
| 3.3.10.1 N1 Ancient..... | 123 |
| 3.3.10.2 N20 Ancient..... | 123 |
| 3.3.10.3 N10 AtuGST | 124 |
| 3.3.10.4 ThermoGST | 124 |
| 3.3.10.5 N1 Tau | 124 |
| 3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 128 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 | 131 |
| ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs) ΑΠΟ ΦΥΤΑ <i>Glycine max</i> ΚΑΙ <i>Phaseolus vulgaris</i> | 131 |
| 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 132 |
| 4.1.1 Φυτικές GSTs..... | 132 |
| 4.1.2 Διαφορική Σάρωση Φθορισμού (DSF)..... | 133 |
| 4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 135 |
| 4.2.1 Βιολογικά υλικά..... | 135 |
| 4.2.2 Σάρωση χημεικής βιβλιοθήκης από το ένζυμο PnGSTU2-2 | 135 |
| 4.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 135 |
| 4.2.4 Μετασηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10 σε κύτταρα <i>E. coli</i> | 136 |
| 4.2.5 Καθαρισμός των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10 με χρωματογραφία συγγένειας..... | 137 |
| 4.2.6 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου GmGSTU8-8 ως προς διαφορετικά υποστρώματα..... | 137 |
| 4.2.7 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH | 137 |
| 4.2.8 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2 και PnGSTU2-2.1 | 138 |
| 4.2.9 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων GmGSTU8-8 και PnGSTU2-2.1 με DSF | 139 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.10 Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην δραστικότητα του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 139 |
| 4.2.11 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 140 |
| 4.2.12 Σάρωση αναλόγων της GSH ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 143 |
| 4.2.13 Σάρωση ενώσεων αναλόγων της GSH ως πιθανών υποστρωμάτων του ενζύμου GmGSTU8-8 | 144 |
| 4.2.14 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10..... | 145 |
| 4.2.15 Υπολογισμός της τιμής IC ₅₀ | 149 |
| 4.2.16 Κινητική μελέτη αναστολής του ενζύμου PnGSTU2-2.1 ως προς το teflubenzuron | 150 |
| 4.2.16.1 Κινητική μελέτη αναστολής του PnGSTU2-2.1 έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης..... | 150 |
| 4.2.16.2 Κινητική μελέτη αναστολής του PnGSTU2-2.1 έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης..... | 150 |
| 4.2.17 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K _i | 151 |
| 4.2.17.1. Υπολογισμός της σταθεράς συναγωνιστικής αναστολής | 151 |
| 4.2.17.2. Υπολογισμός της σταθεράς μικτής αναστολής..... | 152 |
| 4.2.17.3. Υπολογισμός της σταθεράς ανταγωνιστικής αναστολής..... | 153 |
| 4.2.18 Βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου GmGSTU8-8 | 153 |
| 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 154 |
| 4.3.1 Απομόνωση του γονιδίου του GmGSTU8-8 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 154 |
| 4.3.2 Σάρωση βιβλιοθήκης χιμαιρικών ενζύμων | 155 |
| 4.3.3 Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων E. coli και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10. | 156 |
| 4.3.4 Καθαρισμός των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10 με χρωματογραφία συγγένειας..... | 156 |
| 4.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου GmGSTU8-8 | 158 |
| 4.3.6 Κινητική μελέτη των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10 ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH | 162 |
| 4.3.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2 και PnGSTU2-2.1 | 165 |
| 4.3.8 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων GmGSTU8-8 και PnGSTU2-2.1 με DSF | 166 |
| 4.3.9 Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην δραστικότητα του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 167 |
| 4.3.10 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 169 |
| 4.3.11 Σάρωση αναλόγων της GSH ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8..... | 171 |
| 4.3.12 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10..... | 172 |
| 4.3.13 Υπολογισμός της τιμής IC ₅₀ για την αλληλεπίδραση του PnGSTU2-2.1 με το teflubenzuron..... | 174 |
| 4.3.14 Κινητική μελέτη της αναστολής του teflubenzuron με το ένζυμο PnGSTU2-2.1..... | 175 |
| 4.3.15 Μοριακή μοντελοποίηση του ενζύμου GmGSTU8-8 | 177 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.16 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου PnGSTU2-2.1 σε σύμπλοκο με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH (GTB) | 180 |
| 4.3.16.1 N-τελική περιοχή | 182 |
| 4.3.16.2 C-τελική περιοχή | 183 |
| 4.3.16.3 G-θέση | 183 |
| 4.3.16.4 H-θέση | 185 |
| 4.3.16.5 Αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων | 187 |
| 4.3.16.6 Δομική ευελιξία | 189 |
| 4.3.16.7 φ και ψ δίεδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού – Ramachandran Διάγραμμα..... | 190 |
| 4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 193 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5..... | 197 |
| ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs) ΑΠΟ <i>Camelus dromedarius</i> | 197 |
| 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 198 |
| 5.1.1 Ζωϊκές GSTs | 198 |
| 5.1.2 GSTP1-1 | 199 |
| 5.1.3 GSTM1-1 | 199 |
| 5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 200 |
| 5.2.1 Βιολογικά υλικά..... | 200 |
| 5.2.2 Ένζυμα και πρωτεΐνες..... | 200 |
| 5.2.3 Μετασηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1..... | 200 |
| 5.2.4 Καθαρισμός των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1..... | 200 |
| 5.2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1 ως προς διαφορετικά υποστρώματα | 201 |
| 5.2.6 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH | 202 |
| 5.2.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων..... | 203 |
| 5.2.8 Θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου CdGSTP1-1 σε διάφορες θερμοκρασίες | 203 |
| 5.2.9 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων με DSF | 203 |
| 5.2.10 Μελέτη της εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου CdGSTP1-1 από το ιζώδες και το pH..... | 204 |
| 5.2.11 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1..... | 204 |
| 5.2.12 Υπολογισμός της τιμής IC ₅₀ | 205 |
| 5.2.13 Κινητική μελέτη αναστολής του ενζύμου CdGSTM1-1 ως προς το zoxium zoxamide | 205 |
| 5.2.13.1 Κινητική μελέτη αναστολής του CdGSTM1-1 έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης..... | 205 |
| 5.2.13.2 Κινητική μελέτη αναστολής του CdGSTM1-1 έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης..... | 206 |
| 5.2.14 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K _i | 206 |
| 5.2.15 Μοριακή μοντελοποίηση και βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου CdGSTP1-1..... | 206 |
| 5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 207 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.1 Καθαρισμός των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1 | 207 |
| 5.3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα | 208 |
| 5.3.3 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς το CDNB και την GSH..... | 211 |
| 5.3.4 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων | 212 |
| 5.3.5 Θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου CdGSTP1-1 σε διάφορες θερμοκρασίες | 213 |
| 5.3.6 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων με DSF | 214 |
| 5.3.7 Μελέτη της εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου CdGSTP1-1 από το ιζώδες και το pH..... | 216 |
| 5.3.8 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων..... | 218 |
| 5.3.9 Υπολογισμός της τιμής IC ₅₀ για το ένζυμο CdGSTM1-1 έναντι του μυκητοκτόνου zoxium zoxamide..... | 220 |
| 5.3.10 Κινητική μελέτη αναστολής του zoxium zoxamide με το ένζυμο CdGSTM1-1 | 221 |
| 5.3.14 Μοριακή μοντελοποίηση και βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου CdGSTP1-1..... | 223 |
| 5.3.15 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου CdGSTM1-1 σε σύμπλοκο με την GSH και με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH..... | 227 |
| 5.3.15.1 N-τελική περιοχή | 229 |
| 5.3.15.2 C-τελική περιοχή | 230 |
| 5.3.15.3 G-θέση | 231 |
| 5.3.15.4 H-θέση | 234 |
| 5.3.15.5 Αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων | 236 |
| 5.3.15.6 Δομική ευελιξία | 238 |
| 5.3.15.7 φ και ψ διεδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού – Ramachandran Διάγραμμα..... | 239 |
| 5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 241 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 | 244 |
| ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ENTOMOKTONΟΥ teflubenzuron ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟ ENZYMO PvGSTU2-2.1 | 244 |
| 6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 245 |
| 6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 249 |
| 6.2.1 Βιολογικά υλικά και λοιπά αντιδραστήρια..... | 249 |
| 6.2.2 Ακίνητοποίηση του ενζύμου PvGSTU2-2.1 χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη..... | 249 |
| 6.2.3 Κινητική ανάλυση του ακίνητοποιημένου ενζύμου ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH..... | 250 |
| 6.2.4 Υπολογισμός του IC ₅₀ για την ένωση teflubenzuron με ακίνητοποιημένο ένζυμο | 251 |
| 6.2.5 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου και έλεγχος της επαναληψιμότητας της..... | 251 |
| 6.2.6 Ανίχνευση του εντομοκτόνου teflubenzuron σε δείγματα νερού | 252 |
| 6.2.7 Μέτρηση της χρονικής διάρκειας της σταθερότητας του ακίνητοποιημένου ενζύμου | 252 |
| 6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 253 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.1 Ακίνητοποίηση του ενζύμου PnGSTU2-2.1 χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη..... | 253 |
| 6.3.2 Κινητική ανάλυση του ακίνητοποιημένου ενζύμου ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH..... | 253 |
| 6.3.3 Υπολογισμός του IC ₅₀ για την ένωση teflubenzuron με ακίνητοποιημένο ένζυμο | 254 |
| 6.3.4 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου και έλεγχος της επαναληψιμότητας | 255 |
| 6.3.5 Ανίχνευση του εντομοκτόνου teflubenzuron σε δείγματα νερού | 256 |
| 6.3.6 Μέτρηση της χρονικής διάρκειας της σταθερότητας του ακίνητοποιημένου ενζύμου | 257 |
| 6.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 258 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 260 |

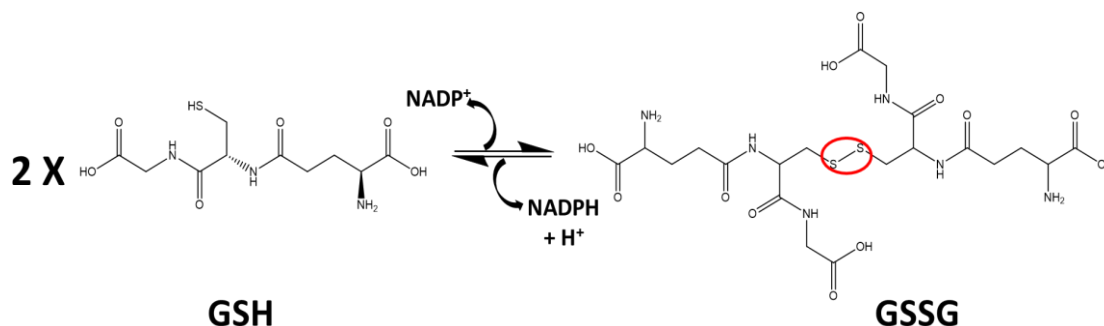
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH)

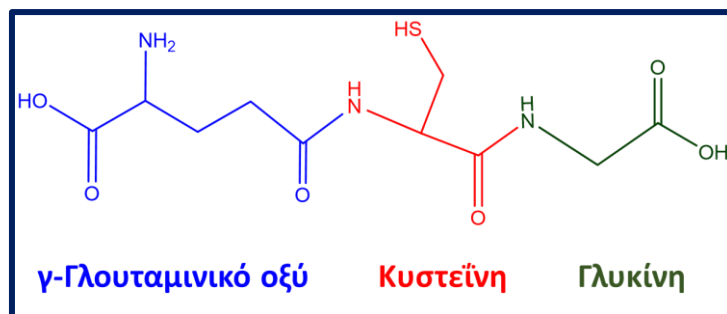
Η γλουταθειόνη (γ-L-γλουταμυλ-L-κυστεΐνη-γλυκίνη, GSH) είναι μια μικρού μοριακού βάρους θειόλη που απαντάται σε αφθονία στα κύτταρα θηλαστικών, σε αρκετά φυτά και στα Gram αρνητικά βακτήρια (Loi *et al.*, 2015; Fabiano *et al.*, 2015; Zechmann *et al.*, 2011; Meister, 1983). Η συγκέντρωση της στο ενδοκυττάριο περιβάλλον κυμαίνεται από 0,5 – 10 mM (Yin *et al.*, 2014) και συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές διεργασίες (Josephy & Mannervic, 2006). Στα κύτταρα, η γλουταθειόνη μπορεί να βρεθεί είτε ελεύθερη είτε προσδεμένη σε άλλες πρωτεΐνες (Pastore *et al.*, 2003). Η ελεύθερη γλουταθειόνη απαντάται σε δυο μορφές, την ανηγμένη (GSH), η οποία επικρατεί με ποσοστό 90 % (Morris *et al.*, 2013) και την οξειδωμένη μορφή (GSSG). Η οξειδωμένη μορφή προκύπτει από οξείδωση και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δυο μορίων γλουταθειόνης κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες (Εικόνα 1.1). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το μεγαλύτερο ποσοστό της γλουταθειόνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (80-85 %), ένα ποσοστό περίπου 10-15 % βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και μια πολύ μικρή ποσότητα απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Yuan & Kaplowitz, 2009). Η οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης (GSSG) μπορεί να επανέλθει στην ανηγμένη μορφή με την δράση του ενζύμου ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (Pastore *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.1: Αντίδραση σχηματισμού της οξειδωμένης μορφής γλουταθειόνης (GSSG) από δυο μόρια ανηγμένης μορφής γλουταθειόνης (GSH). Στον κόκκινο κύκλο, παρουσιάζεται η δισουλφιδική γέφυρα.

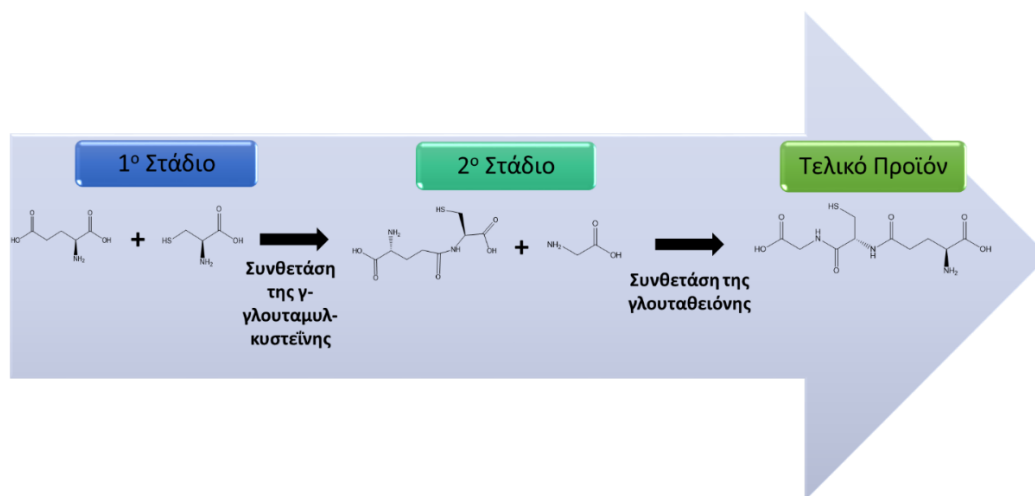
Ο λόγος GSH/GSSG παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, αφού δείχνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού και σε φυσιολογικές συνθήκες πρέπει να είναι 20:1 (Zagorchev *et al.*, 2013). Η εκτιμώμενη τιμή για το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συστήματος κυμαίνεται από -260 mV έως -150 mV (Lushchak, 2012).

Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-L-Glu-L-Cys-Gly) (Εικόνα 1.2) σε δυο αντιδράσεις που εξαρτώνται από το ATP (Sabetta *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.2: Δομή της γλουταθειόνης (GSH).

Στο πρώτο στάδιο, σχηματίζεται η γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη από την σύνδεση της κυστεΐνης με το γλουταμινικό. Το στάδιο αυτό της βιοσύνθεσης είναι καθοριστικό (rate limiting) και καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης. Το δεύτερο στάδιο καταλύεται από την συνθετάση της γλουταθειόνης και συνδέεται η γλυκίνη με την γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη, ώστε να σχηματιστεί η γλουταθειόνη (Εικόνα 1.3) (Lu, 2013). Η δομή της γλουταθειόνης είναι μοναδική, γιατί ο πεπτιδικός δεσμός που ενώνει το γλουταμινικό με την κυστεΐνη γίνεται μέσω της γ-καρβοξυλομάδας του γλουταμινικού και όχι μέσω της α-καρβοξυλομάδας όπως συνηθίζεται. Το μόνο ένζυμο που μπορεί να υδρολύσει αυτόν τον δεσμό είναι η γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση, η οποία απαντάται στην εξωτερική επιφάνεια συγκεκριμένων κυττάρων. Αυτό καθιστά την γλουταθειόνη ένα πολύ σταθερό πεπτίδιο (Lu, 2013).

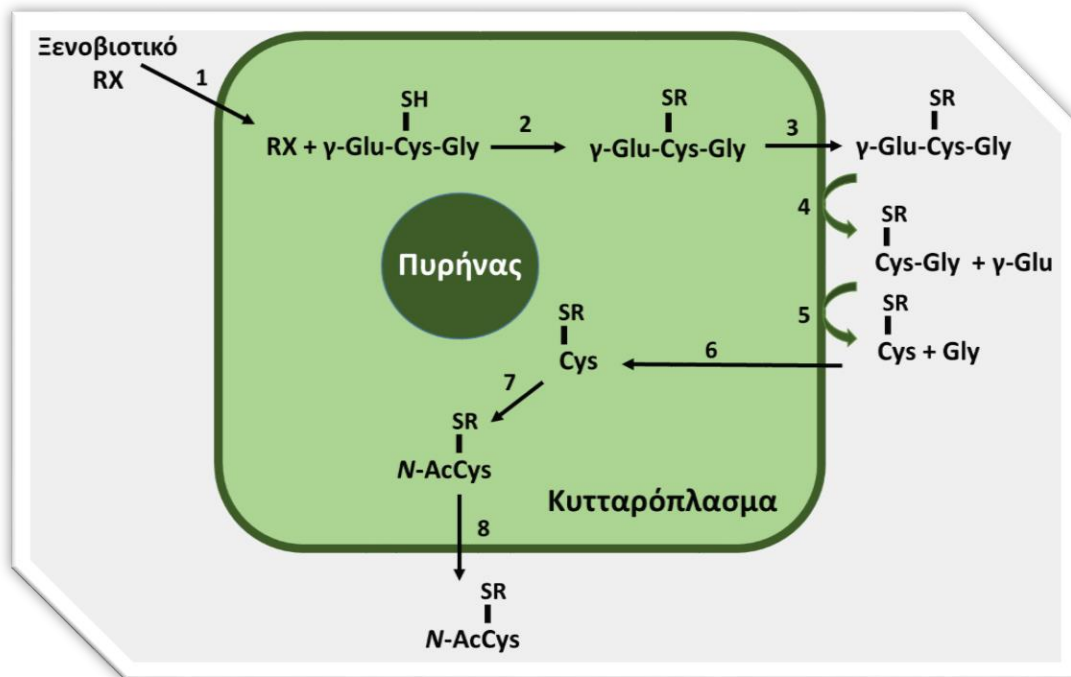


Εικόνα 1.3: Στάδια βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης.

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

- προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτικούς και ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες (Yuan & Kaplowitz, 2009),
- ενισχύει τις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Morris *et al.*, 2013)
- λειτουργεί ως συνένζυμο στη βιοσύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Ji *et al.*, 2015),
- συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση μοριακών διεργασιών σε διάφορα κυτταρικά τμήματα (Jagadeeswaran *et al.*, 2014; Forman *et al.*, 2004),
- αποτελεί φορέα μοριακών μηνυμάτων-σινιάλων, όπως του οξειδίου του αζώτου (Napoli & Ignarro, 2003),
- συμμετέχει στην ανάπτυξη των φυτών, στην προστασία τους από τις ελεύθερες ρίζες και τα περοξειδία, στον μεταβολισμό του θείου κ.α (Syuhada & Jahan, 2016; Diaz-Vivancos *et al.*, 2015),
- συμμετέχει σε αντιδράσεις που εμπλέκονται στον σχηματισμό και την διατήρηση των σουλφυδρυλομάδων άλλων μορίων (Pastore *et al.*, 2003; Pompella *et al.*, 2003).

Γενικά, η γλουταθειόνη φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της οξειδωτικής δράσης διάφορων καταπονητικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία, η ζέστη και η έκθεση στα βαρέα μέταλλα (Asgher *et al.*, 2017; Freeman *et al.*, 2004). Η συγκέντρωση της δεν είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα ή τα υποκυτταρικά οργανίδια όπως έχει ήδη αναφερθεί και όλες οι ανωτέρω λειτουργίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και την αναγωγική κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα μόρια της γλουταθειόνης. Τα δομικά χαρακτηριστικά της γλουταθειόνης, που διευκολύνουν την συμμετοχή της στον εντυπωσιακό αριθμό και στη μεγάλη ποικιλία λειτουργιών, είναι η σύνδεση του γ-γλουταμυλικού και η σουλφυδρυλομάδα. Η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση μιας ποικιλίας ξενοβιοτικών ενώσεων, τα οποία αντιδρούν με την σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης και αποβάλλονται από τον οργανισμό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το σύμπλοκο GSH-ξενοβιοτικό μεταβολίζεται σε μερκαπτουρικό οξύ (Εικόνα 1.4) (Lushchak, 2012).



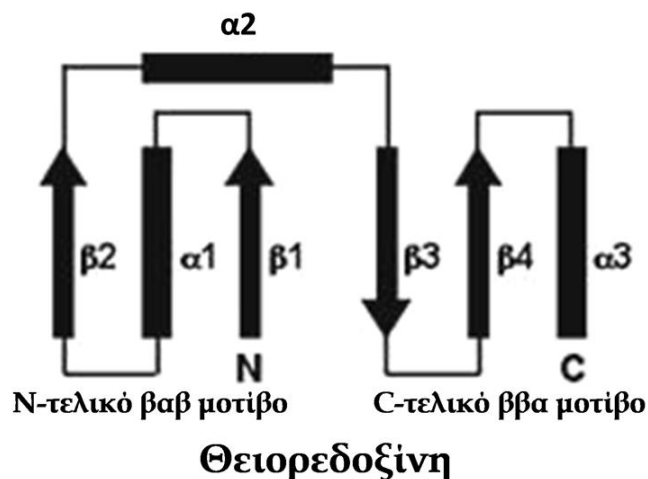
Εικόνα 1.4: Αντίδραση γλουταθειόνης με ένα ξενοβιοτικό και βιοσύνθεση μερκαπτουρικού οξέος. Αρχικά, εισέρχεται το ξενοβιοτικό στο κύτταρο (1). Έπειτα, καταλύεται η αντίδραση πρόσδεσης του ξενοβιοτικού στην γλουταθειόνη από το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (2). Στη συνέχεια, μεταφέρεται έξω από το κύτταρο το σύμπλοκο γλουταθειόνης-ξενοβιοτικού (3), όπου απομακρύνεται το γ-γλουταμινικό οξύ από το ένζυμο τρανσφεράση του γ-γλουταμινικού (4) και ακολουθεί η απομάκρυνση της γλυκίνης από το ένζυμο διπεπτιδάση (5). Το σύμπλοκο κυστεΐνης-ξενοβιοτικού εισέρχεται ξανά στο κύτταρο (6), όπου πραγματοποιείται η ακετυλίωση από το ένζυμο N-ακετυλ-τρανσφεράση, έχοντας ως δότη N-ακετυλίου το ακετυλ-συνένζυμο A, και έτσι παράγεται το μερκαπτουρικό οξύ (7). Τέλος, αποβάλλεται από το κύτταρο (8) (Hinchman & Ballatori, 1994).

Η συσχέτιση της γλουταθειόνης με την βιοσύνθεση του μερκαπτουρικού οξέος ήταν άγνωστη μέχρι το 1959, όταν το πρωτοανέφεραν ο Barnes και οι συνεργάτες του (Barnes *et al.*, 1959) και ο Bray και οι συνάδελφοι του (Bray *et al.*, 1958). Στη συνέχεια, ο Booth και οι συνεργάτες του καθώς επίσης και οι Combes & Stakelum ανακάλυψαν ότι η δέσμευση της γλουταθειόνης με τα διάφορα ξενοβιοτικά καταλύεται από κάποιο ένζυμο, το οποίο βρίσκεται στο συκώτι (Booth *et al.*, 1961; Combes & Stakelum, 1961) και ονομάζεται τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).

1.2 ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗ (Trx)

Το 1964, ο Laurent και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την θειορεδοξίνη, ως δότη ηλεκτρονίων για την ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση στην *E.coli* (Laurent *et al.*, 1964). Πρόκειται για ένα ένζυμο 12 kDa, απαραίτητο για την σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA (Nordlund & Reichard, 2006). Συμμετέχει σε μια ποικιλία λειτουργιών όπως την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Berndt *et al.*, 2008), την ρύθμιση της απόπτωσης κ.α (Ravi *et al.*, 2005). Οι θειορεδοξίνες ανήκουν σε μια τεράστια οικογένεια ενζύμων και βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς (Arts *et al.*, 2016). Το ενεργό κέντρο καθώς και η αναδίπλωση της είναι πολύ συντηρημένα με την πάροδο των ετών, γεγονός που υποδεικνύει ότι ίσως υφίσταται από αρχαίες εποχές (Perez-Jimenez *et al.*, 2011). Η αναδίπλωση της θειορεδοξίνης (Trx fold) είναι μια κοινή δομική αναδίπλωση (Εικόνα 1.5) και αποτελείται από τα μοτίβα βαβ και ββα, τα οποία ενώνονται με μια α-έλικα. Οι δυο β-πτυχωτές επιφάνειες του N-τελικού μοτίβου είναι παράλληλες, ενώ του C-τελικού μοτίβου είναι αντιπαράλληλες. Η αναδίπλωση αυτή υπάρχει σε πολλές πρωτεΐνες, ικανές να εκτελέσουν διαφορετικές λειτουργίες, όπως είναι οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, οι γλουταρεδοξίνες, οι περοξειδάσες κ.α. (Copley *et al.*, 2004). Οι πρωτεΐνες που έχουν αυτήν την χαρακτηριστική αναδίπλωση ανήκουν σε μια υπεροικογένεια (Trx-like), της οποίας τα μέλη παρόλο που οι αλληλουχίες τους δεν έχουν ομοιότητα, ωστόσο μοιράζονται την ίδια αναδίπλωση. Άλλα όμοια δομικά χαρακτηριστικά που έχουν οι πρωτεΐνες αυτής της υπεροικογένειας είναι: α) το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο C-x-x-C, β) ένα κατάλοιπο cis-προλίνης, το οποίο βρίσκεται στην περιοχή πριν την β3-πτυχωτή επιφάνεια και φαίνεται να εμπλέκεται στην πρόσδεση του υποστρώματος, γ) ένα συντηρημένο κατάλοιπο προλίνης στην α1-έλικα και δ) φορτισμένα αμινοξέα κοντά στην ενεργό περιοχή τα οποία εμπλέκονται στον αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων του οξειδοαναγωγικού μηχανισμού (Pedone *et al.*, 2010; Pan & Bardwell, 2006).

Η μεγαλύτερη οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την αναδίπλωση της θειορεδοξίνης είναι οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs).



Εικόνα 1.5: Διάταξη της δευτεροταγούς δομής της θειορεδοξίνης. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως κύλινδροι, ενώ οι β-πτυχωτές επιφάνειες ως βελάκια.

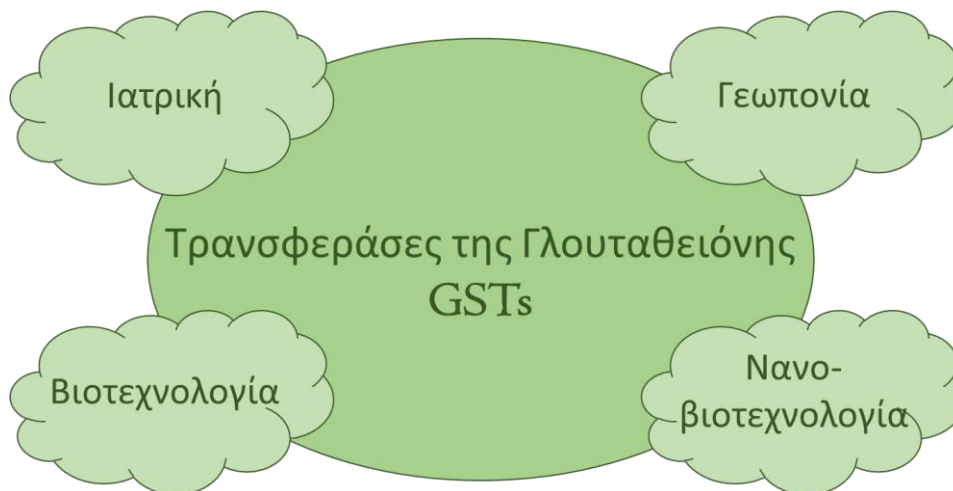
1.3 ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs)

Οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια σημαντική υπερ-οικογένεια ενζύμων (Dong *et al.*, 2016), τα οποία υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς (προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς) ως ισοένζυμα διαφορετικής εκλεκτικότητας και τα οποία αποτελούν προϊόντα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων (Chronopoulou *et al.*, 2012a). Τα ένζυμα αυτά πρωτοανακαλύφθηκαν στα ζώα το 1960 (Wilce & Parker, 1994), ενώ στα φυτά μετά το 1970 (Basantani & Srivastava, 2007) και έκτοτε έχει μελετηθεί εκτενώς η δομή τους, οι λειτουργίες τους καθώς επίσης και οι διαφορετικοί τους ρόλοι σε μια πληθώρα οργανισμών. Πρόκειται για πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου στη Φάση II (Liu *et al.*, 2013) αδρανοποιώντας ενδογενείς ή εξωγενείς τοξικούς παράγοντες (Corticeiro *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, καταλύουν τη νουκλεόφιλη προσβολή της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (R) διαφόρων κυτταροτοξικών, καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ενώσεων (Han *et al.*, 2016; Hasegawa *et al.*, 2007), χωρίς η ενζυμική λειτουργία να επηρεάζεται και να εξαρτάται από συνένζυμο, προσθετική ομάδα ή μεταλλοϊόν, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6 (Armstrong, 1997), όπου το R μπορεί να είναι μια αρωματική, αλειφατική, ετεροκυκλική ή εποξειδική ομάδα και το X ποικιλία ανόργανων ή οργανικών ομάδων. Η αντίδραση της γλουταθειόνης με τα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα ονομάζεται και σύζευξη.



Εικόνα 1.6: Η γενική αντίδραση που καταλύουν οι GSTs.

Το προϊόν της αντίδρασης R-SG (Εικόνα 1.6) είναι περισσότερο υδρόφιλο, μη τοξικό και αποβάλλεται πιο εύκολα από το κύτταρο μέσω αντλιών εκροής MRP (Multidrug Resistance Protein) των μεμβρανών (Pavlidι *et al.*, 2015; Azevedo *et al.*, 2015; Wallace & Redinbo, 2012). Οι πρωτεΐνες MRP των μεμβρανών είναι μέλη της οικογένειας C των μεταφορέων ABC. Πιο συγκεκριμένα, η MRP1 και η MRP2 είναι υπεύθυνες να απομακρύνουν τα σύμπλοκα με την γλουταθειόνη από τον οργανισμό (Hayes *et al.*, 2005). Οι GSTs παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως στην γεωπονία, στην ιατρική, στην βιοτεχνολογία καθώς επίσης και στην νανοβιοτεχνολογία (Εικόνα 1.7) (Perperopoulou *et al.*, 2017).

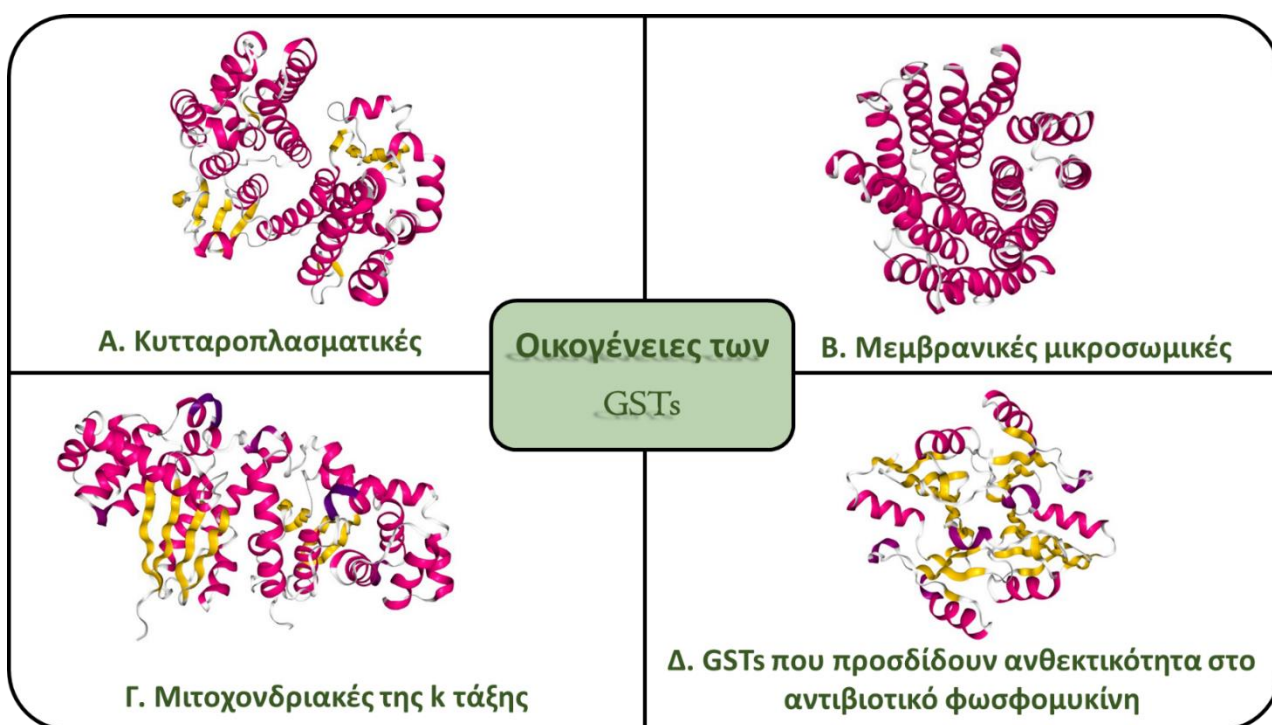


Εικόνα 1.7: Τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογές οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs).

1.3.1 Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs

Οι GSTs χωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες, κάθε μια από τις οποίες περιλαμβάνει πολλά ισοένζυμα (Εικόνα 1.8) (Chatzikonstantinou et al., 2017; Board & Menon, 2013; Chronopoulou & Labrou, 2009):

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



Εικόνα 1.8: Οι οικογένειες των GSTs και μια χαρακτηριστική δομή από κάθε οικογένεια. (A) Κυτταροπλασματική GST τ τάξης από *Glycine max* (κωδικός PDB: 2VO4) (Axarli et al., 2009b), (B) Μεμβρανική μικροσωμική GST από *Rattus norvegicus* (κωδικός PDB: 5I9K) (Kuang et al., 2017), (Γ) GST μιτοχονδριακή της κ τάξης από *Rattus norvegicus* (κωδικός PDB: 1R4W) (Ladner et al., 2004), (Δ) GST ανθεκτική στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη από *Bacillus cereus* (κωδικός PDB: 4JH3) (Thompson et al., 2013).

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

διάφορες τάξεις ανάλογα με τα πρωτοταγή και τεταρτοταγή τους δομικά χαρακτηριστικά (Mashiyama *et al.*, 2014).

Οι μεμβρανικές μικροσωμικές χωρίζονται σε τέσσερις υπο-ομάδες (I-IV) και δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές, αφού δομικά πρόκειται για τριμερή με τρεις ανεξάρτητες ενεργές περιοχές (Morgenstern *et al.*, 2011; Oakley, 2005). Ωστόσο, κάποια από τα μέλη που έχουν μελετηθεί, φαίνεται να χρησιμοποιούν μόνο τη μια από τις τρεις ενεργές περιοχές (Ahmad *et al.*, 2015). Μεταξύ των υπο-ομάδων, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των εκπροσώπων έχουν ομοιότητα μικρότερη από 20 % (Oakley, 2011). Η περισσότερο μελετημένη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας είναι η MGST1, η οποία μοιάζει με την συνθάση του C4 λευκοτριενίου (Kuang *et al.*, 2017). Οι μεμβρανικές μικροσωμικές GSTs συμμετέχουν στην διαδικασία της αποτοξίνωσης, αλλά παίζουν και πολύ σημαντικό ρόλο στην σύνθεση των λευκοτριενίων και προσταγλανδινών (Sthijns *et al.*, 2017; Spahiu *et al.*, 2017).

Οι μιτοχονδριακές της *kappa* τάξης GSTs θεωρούνταν μέλη των κυτταροπλασματικών GSTs, ωστόσο με πρόσφατες έρευνες αποδείχτηκε ότι αποτελούν ξεχωριστή υπεροικογένεια (Mashiyama *et al.*, 2014; Ladner *et al.*, 2004; Jowsey *et al.*, 2003). Υπάρχουν διάφοροι εκπρόσωποι αυτών των ενζύμων στη φύση, όχι όμως στα έντομα (Roncalli *et al.*, 2015). Ο πρώτος εκπρόσωπος αυτής της τάξης απομονώθηκε από το μιτοχονδριακό πλέγμα του ήπατος αρουραίου το 1991 (Harris *et al.*, 1991). Το τυπικό μέγεθος αυτού του ενζύμου καθώς επίσης και η δραστηριότητα του σε συγκεκριμένα υποστρώματα θεωρήθηκαν αρκετά για να χαρακτηριστεί ως GST. Λόγω της χαμηλής ομοιότητας της N-τελικής περιοχής με άλλες GSTs, εντάχθηκε στην τάξη θήτα και θεωρήθηκε ως πρόγονος των GSTs. Ωστόσο, ύστερα από μελέτη και ευθυγράμμιση των αλληλουχιών καθώς επίσης και από φυλογενετικές έρευνες αυξήθηκαν οι αμφιβολίες για τη συγγένεια του με την κυτταροπλασματική οικογένεια και έτσι δημιουργήθηκε μια καινούρια υπεροικογένεια (Robinson *et al.*, 2004).

Οι GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη ανήκουν στη κατηγορία των μεταλλοενζύμων (Ito *et al.*, 2017; Smoukov *et al.*, 2002). Δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές καθώς επίσης η πρωτοταγής δομή τους δε σχετίζεται με καμία άλλη οικογένεια (Beharry & Palzkill, 2005). Οι

συγκεκριμένες GSTs καταλύουν τη προσθήκη της γλουταθειόνης στον άνθρακα-1 της φωσφομυκίνης (Guo *et al.*, 2016).

1.3.2 Κυτταροπλασματικές GSTs

1.3.2.1 Τάξεις

Κάθε οικογένεια υποδιαιρείται σε τάξεις με βασικό κριτήριο την αμινοξική τους αλληλουχία (Mannervic & Danielson, 1988). Ωστόσο, παράλληλα συνεκτιμούνται και άλλα κριτήρια, όπως η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων από τα οποία εκφράζονται, η τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή των ενζύμων (Cummins *et al.*, 2011; Chronopoulou & Labrou, 2009; Sheenan *et al.*, 2001). Ένζυμα τις ίδιας τάξης εμφανίζουν ομοιότητα μεγαλύτερη του 40 % όσον αφορά στην αμινοξική τους αλληλουχία, ενώ μεταξύ των διαφορετικών τάξεων οι πρωτεΐνες έχουν μικρότερη από 25 % ομοιότητα (Wongsantichon & Ketterman, 2005; Oakley, 2005).

Στα θηλαστικά υπάρχουν επτά τάξεις : *alpha* (A), *mu* (M), *pi* (P), *sigma* (S), *theta* (T), *omega* (O) και *zeta* (Z), ενώ στα φυτά υπάρχουν δώδεκα τάξεις : *tau* (U), *phi* (F), *theta* (T), *zeta* (Z), *lamda* (L), *EF1B*, *Ρεδουκτάση του διϋδροασκορβικού (DHAR)*, *απαλογονάση της τετραγλώρο υδροκινόνης (TCHQD)*, *μεταταξίνη (metataxin)*, *αιμερυθρίνη (hemerithrin)*, *iota* (I), *ρεδουκτάση της γλουταθειο-υδροκινόνης (GHR)* (Chronopoulou *et al.*, 2017; Chatzikonstantinou *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2009). Στα βακτήρια, οι τάξεις που έχουν βρεθεί είναι η *beta* (B), *chi* (X), *theta* (T), *ro* (R), *eta* (H) και *zeta* (Z) (Pandey *et al.*, 2015a; Pandey *et al.*, 2015b; Skopelitou *et al.*, 2012; da Fonseca *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Allocati *et al.*, 2009; Wikteliu & Stenberg, 2007). Ενώ, στα έντομα βρέθηκαν η *zeta* (Z), *theta* (T), *delta* (D), *sigma* (S), *omega* (O) και *epsilon* (E), από τις οποίες η *epsilon* και η *delta* απαντώνται μόνο στα έντομα (du Rand *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015). Τέλος, οι τάξεις στους μύκητες είναι οι εξής: *omega* (O), *phi* (F), *Ure2p*, *MAK16*, *EF1B*, *FuA*, *GTT1*, *GTT2* και *GHR* (Aranda, 2016; Shen *et al.*, 2015).

Οι Atkinson & Babbit χώρισαν τις κυτταροπλασματικές GSTs με βάση ένα ακόμα κριτήριο, αφού παρατήρησαν τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται η σύζευξη της γλουταθειόνης. Έτσι, παρουσίασαν δυο υποομάδες των κυτταροπλασματικών GSTs, δηλαδή της S/C-GSTs (Serine/Cysteine), οι οποίες χρησιμοποιούν το αμινοξύ σερίνη ή κυστεΐνη για την κατάλυση και τις Y-GSTs (Tyrosine), οι οποίες χρησιμοποιούν αντίστοιχα την τυροσίνη. Οι τάξεις *beta*, *omega*, *theta*, *phi*, *tau* και *zeta* ανήκουν στην υποομάδα των S/C-GSTs, ενώ οι τάξεις *alpha*, *mu*, *pi* και *sigma* ανήκουν στις Y-GSTs (Oakley, 2011; Atkinson & Babbit, 2009).

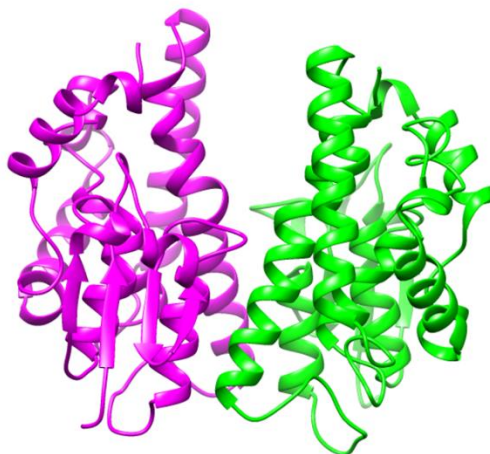
Πίνακας 1.1: Οργανισμοί, τάξεις και καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο των κυτταροπλασματικών GSTs.

| ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ | ΤΑΞΗ | ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ ΑΜΙΝΟΞΙΚΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟ |
|-------------------|-----------------|--------------------------------|
| ΘΗΛΑΣΣΤΙΚΑ | Alpha (A) | Τυροσίνη (Tyr) |
| | Mu (M) | Τυροσίνη (Tyr) |
| | Pi (P) | Τυροσίνη (Tyr) |
| | Theta (T) | Σερίνη (Ser) |
| | Zeta (Z) | Σερίνη (Ser) |
| | Omega (O) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | Sigma (S) | Τυροσίνη (Tyr) |
| ΦΥΤΑ | Tau (U) | Σερίνη (Ser) |
| | Phi (F) | Σερίνη (Ser) |
| | Theta (T) | Σερίνη (Ser) |
| | Zeta (Z) | Σερίνη (Ser) |
| | Lamda (L) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | DHAR | Κυστεΐνη (Cys) |
| | EF1Bγ | Άγνωστο |
| | TCHQD | Άγνωστο |
| | Μεταταξίνη | Άγνωστο |
| | Αιμερυθρίνη (H) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | Iota (I) | Κυστεΐνη (Cys) |
| GHR | Κυστεΐνη (Cys) | |
| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | Beta (B) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | Chi (X) | Άγνωστο |
| | Theta (T) | Σερίνη (Ser) |
| | Zeta (Z) | Σερίνη (Ser) |
| | Eta (H) | Αργινίνη (Arg) |
| | Ro (R) | Άγνωστο |
| ΕΝΤΟΜΑ | Zeta (Z) | Σερίνη (Ser) |
| | Theta (T) | Σερίνη (Ser) |
| | Delta (D) | Σερίνη (Ser) |
| | Sigma (S) | Τυροσίνη (Tyr) |
| | Omega (O) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | Epsilon (E) | Σερίνη (Ser) |
| ΜΥΚΗΤΕΣ | Omega (O) | Κυστεΐνη (Cys) |
| | Phi (F) | Σερίνη (Ser) |
| | Ure2p | Άγνωστο |
| | GTT1 | Άγνωστο |
| | GTT2 | Άγνωστο |
| | GHR | Άγνωστο |
| | MAK16 | Άγνωστο |
| | EFIB | Άγνωστο |
| | FuA | Άγνωστο |

1.3.2.2 Δομή

Η τρισδιάστατη δομή πολλών κυτταροπλασματικών GSTs από διάφορους οργανισμούς έχουν καθοριστεί κρυσταλλογραφικά και τα αποτελέσματα έχουν δείξει μια εκπληκτικά συντηρημένη δομή, παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ των διαφορετικών

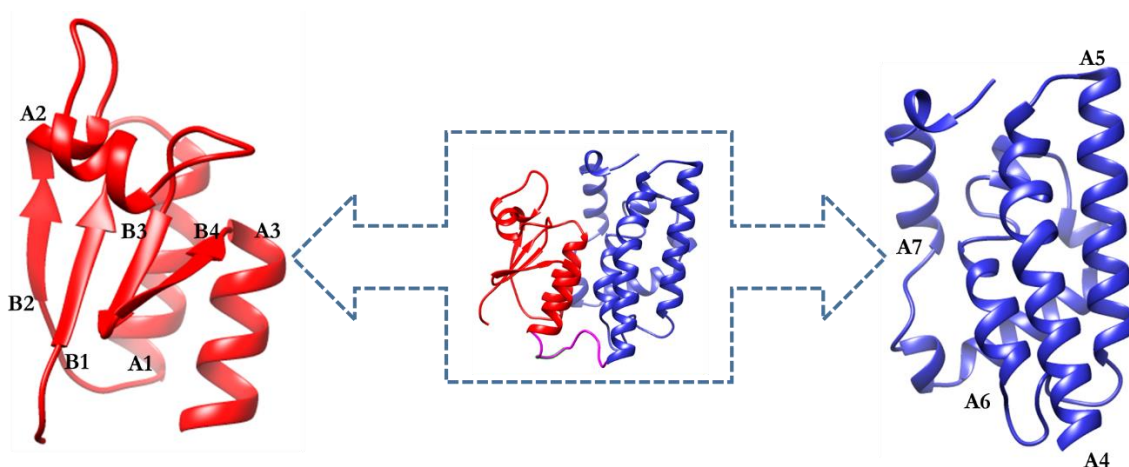
αλληλουχιών (Mashiyama *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2000). Πρόκειται για διμερή (ομοδιμερή ή ετεροδιμερή) δυο υπομονάδων, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 200-250 αμινοξικά κατάλοιπα με μοριακό βάρος ~25-28 kDa (Axarli *et al.*, 2009a) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς του ενζύμου *GmGSTU4-4* (*Glycine max*) (κωδικός pdb: 2no4) (Axarli *et al.*, 2009b). Η μια υπομονάδα απεικονίζεται με μωβ χρώμα, ενώ η δεύτερη με πράσινο. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Η κάθε υπομονάδα χωρίζεται σε δυο περιοχές, τη N-τελική περιοχή που αποτελείται από α -έλικες και από β -πτυχωτές επιφάνειες (τοπολογία βαβαββα) και την C-τελική περιοχή, η οποία αποτελείται μόνο από α -έλικες (Εικόνα 1.10). Επίσης, κάθε υπομονάδα περιέχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο με ευδιάκριτες περιοχές δέσμησης του υποστρώματος: μια μη εξειδικευμένη περιοχή υδρόφοβης φύσεως (θέση H- που καλύπτει περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης και βρίσκεται στη C-τελική περιοχή), όπου δεσμεύονται ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις ευρέος φάσματος (Park *et al.*, 2013) και μια δεύτερη θέση που δεσμεύεται η GSH (θέση G- που περιλαμβάνει τα δυο τρίτα της πρωτεΐνης και βρίσκεται στη N-τελική περιοχή) (Oakley, 2011; Jakobson *et al.*, 1979). Ακόμα δεν είναι γνωστό αν η δημιουργία του διμερούς επηρεάζει την βιολογική λειτουργία, ωστόσο φαίνεται να ενισχύει την σταθερότητα της πρωτεΐνης και να παρέχει μια κατάλληλη δομή για αποτελεσματική κατάλυση (Wu & Dong, 2012; Armstrong, 2010). Στο παρελθόν, πολλές έρευνες πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι καταλυτικές και δομικές ιδιότητες των μονομερών. Ωστόσο, πολλές φορές τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, ο Adler και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι το ένζυμο GSTP1-1 ρυθμίζει την δράση του JNK, δημιουργώντας σύμπλοκα JNK-GST ως μονομερές, ενώ ο Aceto και η ομάδα του υποστήριξαν ότι η μονομερής μορφή του ίδιου ενζύμου είναι τελείως ανενεργή (Adler *et al.*, 1999; Aceto *et al.*, 1992). Ένζυμα άλλων τάξεων φαίνεται να είναι

λειτουργικά ως μονομερή, όπως για παράδειγμα GSTs της τάξης *lamda* (Lallement *et al.*, 2014a).



Εικόνα 1.10: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *GmGSTU4-4* (*Glycine max*) (κωδικός pdb: 2vo4) (Axarli *et al.*, 2009a). Η N-τελική περιοχή απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, ενώ η C-τελική περιοχή με μπλε. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Η σταθεροποίηση του διμερούς επιτυγχάνεται με διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων (Erhardt & Dirr, 1995), όπως οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η σημαντικότερη υδρόφοβη αλληλεπίδραση είναι το ονομαζόμενο μοτίβο κλειδιού-κλειδαριάς, το οποίο δημιουργείται σχεδόν σε όλες τις τάξεις των GSTs (Huang *et al.*, 2008; Vargo *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα, ένα αρωματικό κατάλοιπο της N-τελικής περιοχής της μιας υπομονάδας λειτουργεί ως κλειδί, το οποίο μπαίνει σε μια κλειδαριά που δημιουργούν υδρόφοβα κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής της άλλης υπομονάδας. Έρευνες έχουν δείξει ότι η $\alpha 1$ -έλικα παίζει τον σημαντικότερο ρόλο σε αυτό το μοτίβο και κάποιο από τα αμινοξέα αυτής της έλικας παίζουν τον ρόλο του κλειδιού (Parbhoo *et al.*, 2011). Το μοτίβο αυτό έχει βρεθεί στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των υπομονάδων των τάξεων *alpha*, *phi*, *mu*, *zeta*, *tau* και *pi* (Wu & Dong, 2012; Thom *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2005). Στις τάξεις *alpha*, *mu* και *pi*, το αμινοξύ φαινυλαλανίνη (Phe) φαίνεται να παίζει τον ρόλο του κλειδιού (Perbandt *et al.*, 2015; Stevens *et al.*, 2000).

Όσον αφορά στις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, η σταθεροποίηση του διμερούς βασίζεται σε ηλεκτροστατικές επιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων των υπομονάδων. Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις εμφανίζουν οι τάξεις *sigma* και *theta* (Huang *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 1995; Rossjohn *et al.*, 1998). Σε κάθε

τάξη GST, οι αλληλεπιδράσεις είναι εξειδικευμένες εμποδίζοντας τη δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ υπομονάδων διαφορετικών τάξεων (Hayes *et al.*, 2005; Frova, 2006). Οι δυο υπομονάδες μπορεί να είναι ίδιες (ομοδιμερές), αποτέλεσμα έκφρασης ενός μόνο γονιδίου ή διαφορετικές (ετεροδιμερές), δηλαδή κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Sheehan *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Schröder, 2001). Τα ετεροδιμερή παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον αφού έχει παρατηρηθεί ότι επάγονται σε καταστάσεις έντονης ορμονικής δραστηριότητας και στρες (Schröder, 2001).

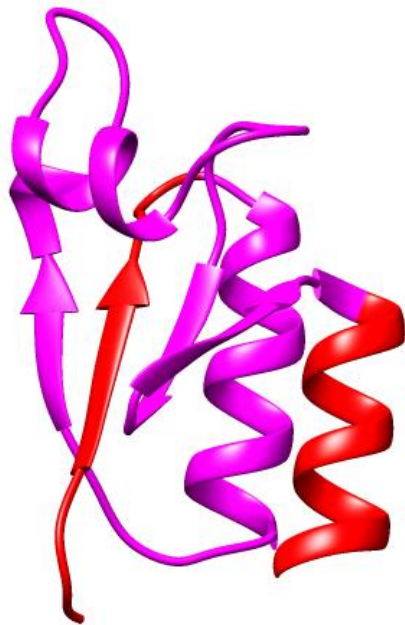
Ενεργός περιοχή

Η ενεργός περιοχή είναι η περιοχή δέσμευσης των υποστρωμάτων και αποτελείται από την υδρόφιλη G- και την H- θέση (Stoddard *et al.*, 2017). Κάθε υπομονάδα έχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο, όπου δεσμεύεται αρχικά η γλουταθειόνη (G- θέση) και έπειτα το υδρόφοβο υπόστρωμα (H- θέση). Η πλήρης λειτουργικότητα της ενεργούς περιοχής απαιτεί τον διμερισμό και την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο υπομονάδων (Fabrini *et al.*, 2009).

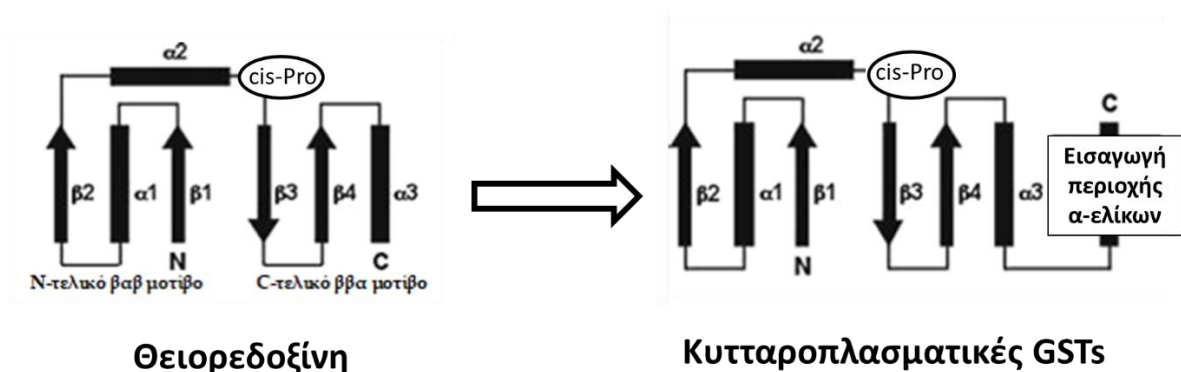
- **G- θέση**

Η G- θέση βρίσκεται στη N- τελική περιοχή και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της GSH (Εικόνα 1.11). Σε κάθε μονομερές προσδέεται ένα μόριο GSH. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα, ωστόσο το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο, που είναι υπεύθυνο για τη κατάλυση της αντίδρασης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τάξεων (Πίνακας 1.1) (Board & Menon, 2013). Το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο βρίσκεται μετά την β1-πτυχωτή επιφάνεια του N-τελικού άκρου και συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της σουλφυδρυλομάδας της γλουταθειόνης, ώστε να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου (GS⁻) (Axarli *et al.*, 2009a; Labrou *et al.*, 2001). Όταν το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο είναι σερίνη ή τυροσίνη, το θειολοανιόν παράγεται με τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας του καταλυτικού αμινοξέος και την σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης, ενώ όταν πρόκειται για κυστεΐνη σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός (Oakley, 2011). Στην τεταρτοταγή δομή της G-θέσης παρατηρείται μια χαρακτηριστική GST αναδίπλωση, ίδια με αυτήν της θειορεδοξίνης, η οποία θεωρείται πρόγονος των GSTs (Εικόνα 1.12) (Armstrong, 1997). Η G- θέση αποτελείται από ένα N-τελικό

μοτίβο (βαβ), το οποίο ξεκινάει με την β1-πτυχωτή επιφάνεια, την α1-έλικα και την β2-πτυχωτή επιφάνεια, η οποία είναι παράλληλη με την πρώτη. Στη συνέχεια, ένας βρόχος οδηγεί στην α2-έλικα, η οποία συνδέεται με το C-τελικό μοτίβο αυτής της θέσης. Αυτό το μοτίβο αποτελείται από την β3- και β4-πτυχωτή επιφάνεια, οι οποίες είναι αντιπαράλληλες μεταξύ τους και ακολουθούνται από την α3-έλικα. Ο βρόχος που συνδέει την α2-έλικα με την β3-πτυχωτή επιφάνεια διαθέτει ένα χαρακτηριστικό αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης σε cis διαμόρφωση, υψηλά συντηρημένο σε όλες τις GSTs (Εικόνα 1.12) (Mohsenzadeh *et al.*, 2011). 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 (Chronopoulou *et al.*, 2017; Armstrong, 1997).



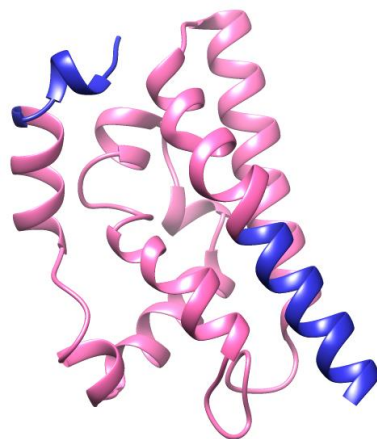
Εικόνα 1.11: Τρισδιάστατη δομή της N-τελικής περιοχής του ενζύμου *GmGSTU4-4* (*Glycine max*) (κωδικός pdb: 2no4) (Axarli *et al.*, 2009a). Η N-τελική περιοχή απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, ενώ η G-θέση με μωβ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.



Εικόνα 1.12: Διάταξη της δευτεροταγούς δομής της θειορεδοξίνης (αριστερά) και η αναδίπλωση των κυτταροπλασματικών GSTs ως εξέλιξη της δομής της θειορεδοξίνης (δεξιά).

- **H-θέση**

Η H-θέση βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και αποτελεί θέση δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Εικόνα 1.13). Αποτελείται αποκλειστικά από α-έλικες και πρόκειται για υδρόφοβη περιοχή με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της να χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002; Sheehan *et al.*, 2001). Τα αμινοξικά κατάλοιπα από τα οποία αποτελείται δεν είναι συντηρημένα, γι αυτό μπορούν να δεσμεύουν μια ποικιλία υποστρωμάτων (Cummins *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2005). Η μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που μπορούν να δεσμευτούν σε αυτή τη θέση καθιστά αδύνατη κάθε προσπάθεια ταξινόμησης των GSTs βάσει του ξενοβιοτικού υποστρώματος. Λόγω της δομικής ευελιξίας της συγκεκριμένης θέσης, τα υποστρώματα είναι ελεύθερα να προσδεθούν με διάφορες δομικές προσαρμογές (Josephy & Mannervik, 2006).



Εικόνα 1.13: Τρισδιάστατη δομή της C-τελικής περιοχής του ενζύμου *GmGSTU4-4* (*Glycine max*) (κωδικός pdb: 2vo4) (Axarli *et al.*, 2009a). Η C-τελική περιοχή απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η H-θέση με ροζ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

- **L-θέση**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι GSTs παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων. Μια από αυτές είναι η δέσμευση υδρόφοβων ενώσεων (αίμη, χολυρεθρίνη, φλαβονοειδή, φυτικές ορμόνες κ.α), οι οποίες δεν αποτελούν υποστρώματα των ενζύμων. Η θέση που δεσμεύονται αυτές οι ουσίες ονομάζεται L-θέση.

Η ακριβής τοποθεσία της L-θέσης είναι διαφορετική για κάθε GST (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Για παράδειγμα, στο ένζυμο GSTU4-4 από σόγια, η L-θέση βρίσκεται σε μια υδρόφοβη επιφάνεια, η οποία αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: Trp11, Arg20, Tyr30, Tyr32, Leu199 και Pro200 (Axarli *et al.*, 2009a). Από την

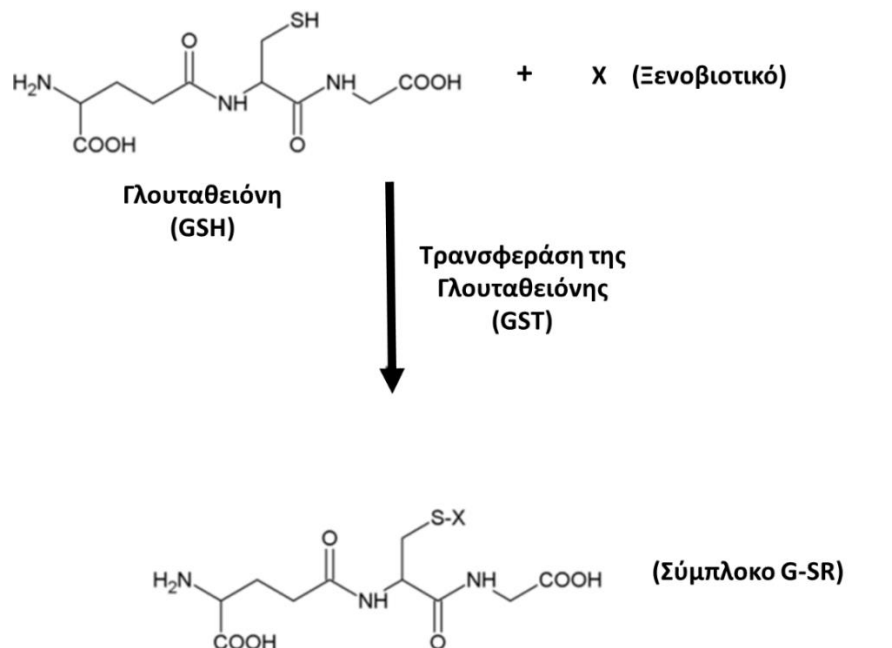
άλλη μεριά, η L-θέση ενός ενζύμου GST του οργανισμού *Schistosoma japonica* καθώς επίσης και του ενζύμου hGSTO1-1 βρίσκεται στο σημείο διεπαφής του διμερούς (Brock *et al.*, 2013; McTigue *et al.*, 1995), ενώ η L-θέση της *phi* τάξης του *Arabidopsis thaliana* βρίσκεται δίπλα στη G-θέση (Reinemer *et al.*, 1996).

Ο ακριβής ρόλος της L-θέσης, επίσης, δεν είναι τελείως ξεκάθαρος. Πιθανότατα, ο κεντρικός ρόλος της να είναι η διευκόλυνση μεταφοράς μεταβολιτών μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων ή η αποθήκευση τους (Lallement *et al.*, 2014b). Επιπλέον, οι Lu και Atkins υπέδειξαν τον πιθανό αντιοξειδωτικό ρόλο που παίζει η δράση των GSTs ως προσδέτες χημικά ευαίσθητων ενώσεων (ligandins) (Lu & Atkins, 2004).

1.3.3 Καταλυτικός μηχανισμός των GSTs

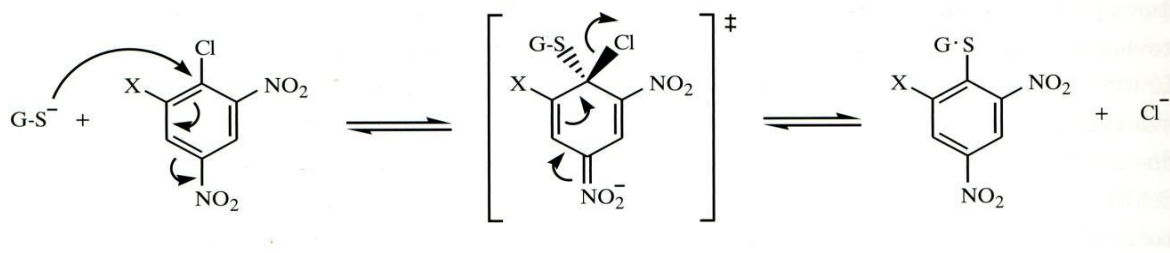
Ο πιο σημαντικός ρόλος των GSTs είναι η συμμετοχή τους στον μεταβολισμό διάφορων ξενοβιοτικών ενώσεων. Με τον όρο ξενοβιοτικές ενώσεις εννοούνται διάφορες ενώσεις ξένες προς τον οργανισμό, όπως φάρμακα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, βιομηχανικά ενδιάμεσα, περιβαλλοντικοί ρύποι κ.α.

Η GST καταλύει την πυρηνόφιλη προσβολή του θειολοανιόντος της κυστεΐνης της GSH (1^ο υπόστρωμα, G-S⁻) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο διάφορων οργανικών υδρόφοβων ενώσεων (2^ο υπόστρωμα, R-X) του κυττάρου, σχηματίζοντας αντίστοιχες ενώσεις συζεύξεως (G-SR), αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους και βοηθώντας την έκκρισή τους από το κύτταρο (Wang *et al.*, 2009; Abel *et al.*, 2004; Townsend & Tew, 2003) (Εικόνα 1.14). Συγκεκριμένα, το βασικό γεγονός στον καταλυτικό μηχανισμό των GSTs είναι η αποπρωτονίωση της θειολομάδας της κυστεΐνης της GSH, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της τιμής pK_a της GSH, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το νουκλεόφιλο σουλφυδρυλικό ανιόν (GS⁻) (Broad & Menon, 2013; Dourado *et al.*, 2008). Η παραπάνω διαδικασία διευκολύνεται με ένα αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr), κυστεΐνης (Cys) ή σερίνης (Ser). Στη συνέχεια, το νουκλεόφιλο σουλφυδρυλικό ανιόν αντιδρά με ένα αρωματικό ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα (π.χ CDNB) στην Η-θέση, μέσω νουκλεόφιλης προσθήκης. Το ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα καθίσταται αβλαβές και υδατοδιαλυτό και έτσι απεκκρίνεται εύκολα από τον οργανισμό. Η αντίδραση αυτή αποτελεί βασική μορφή άμυνας του κυττάρου (Josephy & Mannervic, 2006; Dixon *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1997).



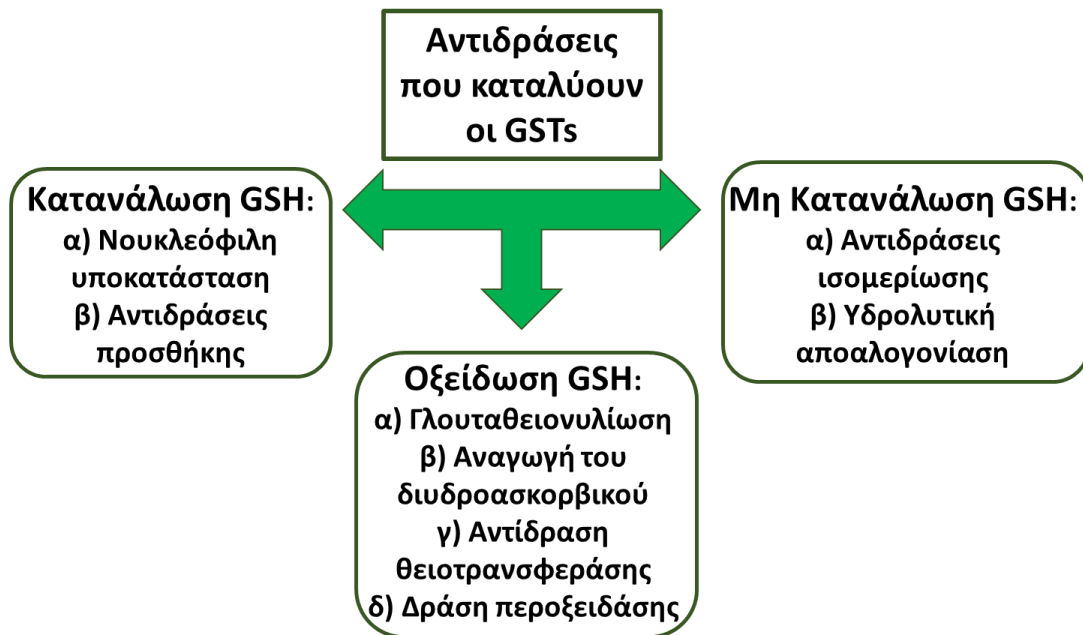
Εικόνα 1.14: Αντίδραση συζευγματοποίησης της γλουταθειόνης (GSH) με ξενοβιοτική ένωση X, η οποία καταλύεται από το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), προς σχηματισμό του συμπλόκου G-SR.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα του μηχανισμού καταλύσεως του ενζύμου είναι η αντίδραση με το υδρόφοβο συνθετικό υπόστρωμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως υπόστρωμα προσδιορισμού του ενζύμου (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Μηχανισμός αντίδρασης της GSH με το CDNB, η οποία καταλύεται από το ένζυμο GST (Κλώνης, 2007).

Οι αντιδράσεις που καταλύουν οι GSTs μπορούν να χωριστούν σε τρεις τύπους σύμφωνα με τον ρόλο που παίζει η γλουταθειόνη. Συγκεκριμένα, πρόκειται για αντιδράσεις στις οποίες η GSH α) καταναλώνεται, β) δεν καταναλώνεται και γ) οξειδώνεται (Εικόνα 1.16) (Deponte, 2013).



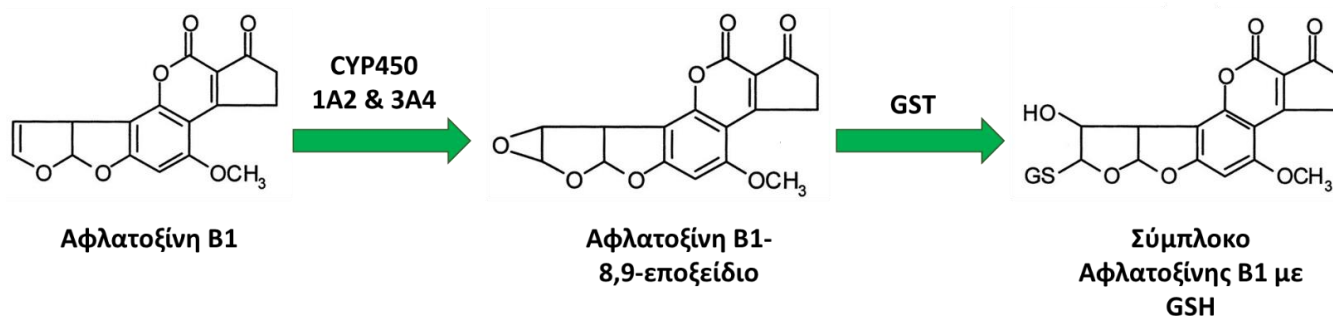
Εικόνα 1.16: Τύποι των αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από GSTs.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της δραστηριότητας των GSTs είναι το υπόστρωμα CDNB, αφού οι GSTs καταλύουν αντιδράσεις νουκλεόφιλης υποκατάστασης ενός αρυλ-αλογονιδίου ή μιας νιτρο-ομάδας. Τα συγκεκριμένα υποστρώματα είναι ήπια ηλεκτρονιόφιλα και έτσι αντιδρούν με την γλουταθειόνη (Hayes *et al.*, 2005). Οι αντιδράσεις νουκλεόφιλης υποκατάστασης μπορούν να περιλαμβάνουν είτε μεταβολίτες που προέρχονται από αντιδράσεις οξείδωσης, είτε να εμφανιστούν ως πρωταρχικές μεταβολικές αντιδράσεις (Testa & Clement, 2015).

Επίσης, οι GSTs καταλύουν μια ποικιλία αντιδράσεων προσθήκης που περιλαμβάνουν εποξειδία, ισοθειοκυανικά παράγωγα, κινόνες και α-, β- ακόρεστα καρβονύλια (Sherratt & Hayes, 2001).

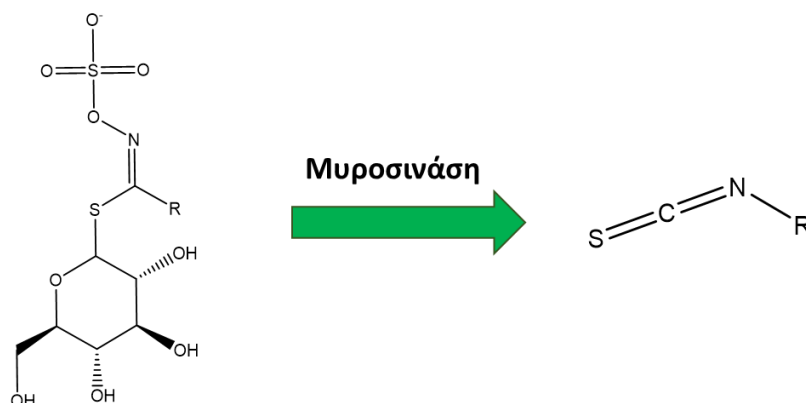
Ένας μεγάλος αριθμός επικίνδυνων εποξειδίων, όπως η αφλατοξίνη και οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-PAHs) αποτοξινώνονται από τις GSTs, μέσω προσθήκης της GSH. Η αφλατοξίνη B1 (AFB1) είναι η πιο τοξική, καρκινογόνος και μεταλλαξογόνος τοξίνη της ομάδας των αφλατοξινών (Yilmaz *et al.*, 2017). Η συμπλοκοποίηση της με την GSH αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό προστασίας διάφορων οργανισμών (Εικόνα 1.17) (Hayes *et al.*, 2005). Όσον αφορά στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πρόκειται για περιβαλλοντικούς ρύπους, εξαιρετικά καρκινογόνους για τους οργανισμούς (Shimada, 2006). Τα στάδια μεταβολισμού αυτών των ενώσεων είναι αρκετά παρόμοια με τα στάδια μεταβολισμού της μυκοτοξίνης. Αρχικά, μεταβολίζονται από τα ένζυμα CYP450 αλλά και

από την υδρολάση των εποξειδίων και τα προϊόντα-εποξειδία συμπλοκοποιούνται με την GSH με την βοήθεια των GSTs (Choi *et al.*, 2010). Η σημαντικότητα των GSTs στην αποτοξίνωση αυτών των προϊόντων επιβεβαιώθηκε όταν πραγματοποιήθηκε έρευνα σε γυναίκες οι οποίες δεν είχαν το ένζυμο GSTM και φάνηκε ότι διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης για καρκίνο στον πνεύμονα (Moorthy *et al.*, 2015; Bennett *et al.*, 1999).



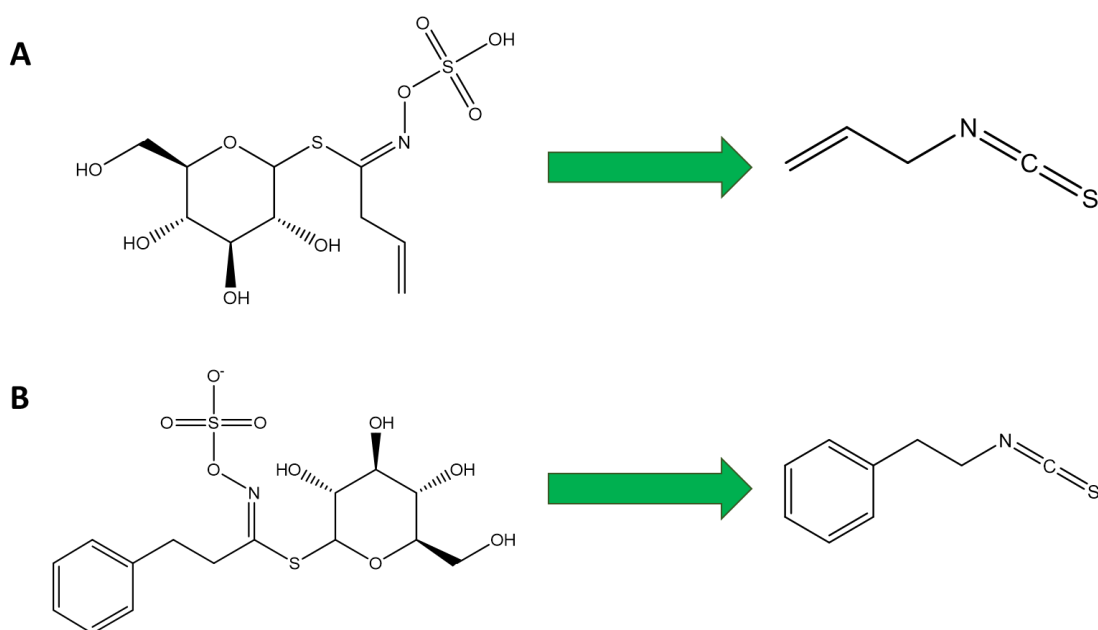
Εικόνα 1.17: Στάδια αποτοξίνωσης της αφλατοξίνης Β1. Κατά το πρώτο στάδιο, η αφλατοξίνη Β1 οξειδώνεται από τα ένζυμα CYP450 και σχηματίζεται το εποξείδιο. Αυτή η μετατροπή της αφλατοξίνης σε εποξείδιο είναι η φάση της αντίδρασης που επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση σε κυτταρικά μακρομόρια (π.χ DNA). Τα προϊόντα που παράγονται είναι αρκετά ανθεκτικά στις διεργασίες επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα την πρόκληση γονιδιακής μετάλλαξης. Στη φάση II της αποτοξίνωσης, δημιουργείται το σύμπλοκο αφλατοξίνης με την γλουταθειόνη, αντίδραση η οποία καταλύεται από GSTs. Τέλος, αυτό το σύμπλοκο αποβάλλεται από τον οργανισμό (Yilmaz *et al.*, 2017).

Μια άλλη ομάδα ενώσεων, η οποία αντιδρά με την GSH είναι τα ισοθειοκυανικά παράγωγα (ITCs) (Chronopoulou *et al.*, 2011). Τα κραμβοειδή φυτά, όπως είναι το λάχανο, το μπρόκολο κ.α., περιέχουν κάποιες οργανικές ενώσεις που ονομάζονται γλυκοσινολάτες (GLS). Όταν τα μέρη του φυτού που περιέχουν αυτές τις ενώσεις καταστραφούν από κάποια αιτία, οι γλυκοσινολάτες υδρολύονται σε ισοθειοκυανικά παράγωγα (Εικόνα 1.18). Η υδρολύση εξαρτάται από το ένζυμο μυροσινάση (Gründemann & Huber, 2017).



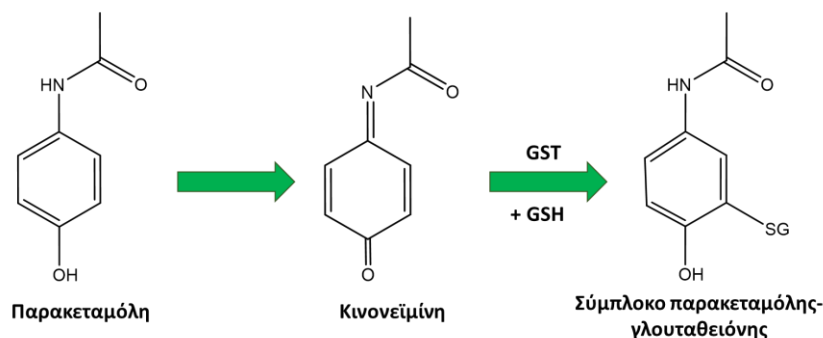
Εικόνα 1.18: Υδρολύση της γενικής δομής των γλυκοσινολατών από το ένζυμο μυροσινάση και η γενική δομή των ισοθειοκυανικών παραγώγων.

Κάποια από τα πιο κοινά ισοθειοκυανικά παράγωγα είναι το άλλυλ-ισοθειοκυανικό παράγωγο (AITC) (Εικόνα 1.19), το οποίο προέρχεται από την αλειφατική γλυκοσινολάτη σινιγρίνη, από λάχανο, μουστάρδα κ.α., καθώς επίσης και το φαινεθυλ-ισοθειοκυανικό παράγωγο (PEITC) που παράγεται από την αρωματική γλυκοναστουρίνη από γουασάμπι (Recio *et al.*, 2017; Fimognari *et al.*, 2012). Τα ισοθειοκυανικά παράγωγα αντιδρούν μέσω της νουκλεόφιλης θειολομάδας της γλουταθειόνης, δημιουργώντας διθειοκαρβαμίδια, τα οποία είναι πιο υδατοδιαλυτά που απομακρύνονται εύκολα από τον οργανισμό (Jeschke *et al.*, 2016).



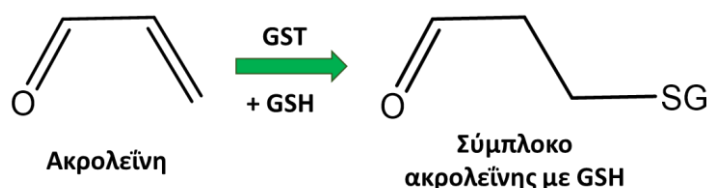
Εικόνα 1.19: Υδρόλυση της γλυκοσινολάτης σινιγρίνης σε άλλυλ-ισοθειοκυανικό παράγωγο (A) και της γλυκοναστουρίνης σε φαινεθυλ-ισοθειοκυανικό παράγωγο (B).

Επιπλέον, οι κινόνες (ορθο- και παρα-) εμπλέκονται σε αντιδράσεις προσθήκης της γλουταθειόνης, προκειμένου να μεταβολιστούν και να απομακρυνθούν από τον οργανισμό. Οι περισσότερες κινόνες μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με την γλουταθειόνη με σκοπό την εξάλειψή τους (Watanabe *et al.*, 2004). Ένα φαρμακευτικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης παρέχεται από τον τοξικό μεταβολίτη κινονεΐμίνης της παρακεταμόλης (Εικόνα 1.20). Το σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη απεκκρίνεται από τον οργανισμό ως μερκαπτουρικό οξύ. Πρόκειται για μια πολύ σημαντική αντίδραση αφού οι κινόνες είναι εξαιρετικά ηπατοτοξικές και μπορούν να προκαλέσουν μέχρι και θάνατο. Παρόλα αυτά, οι αντιδράσεις αυτές δεν αποτελούν μόνο αντιδράσεις αποτοξίνωσης, καθώς μερικά από αυτά τα σύμπλοκα μετασχηματίζονται περαιτέρω σε ενεργά προϊόντα (Monks & Lau, 1997).



Εικόνα 1.20: Μεταβολικό μονοπάτι της παρακεταμόλης μέσω δημιουργίας συμπλόκου με την γλουταθειόνη. Το σύμπλοκο σχηματίζεται με τον τοξικό μεταβολίτη κινονεΐμίνη.

Ένας άλλος τύπος αντίδρασης προσθήκης που καταλύουν οι GSTs είναι και η προσθήκη σουλφυδρυλίου σε διπλούς δεσμούς άνθρακα ή αλλιώς αντίδραση προσθήκης Michael (Mahajan & Atkins, 2005). Μια συχνή περίπτωση αντιδράσεων προσθήκης της GSH είναι σε α-, β- ακόρεστα καρβονύλια. Αυτές οι αντιδράσεις γενικά θεωρούνται ένα πολύ σημαντικό στάδιο αποτοξίνωσης, παρόλο που έχει αποδειχτεί ότι τα σύμπλοκα που προκύπτουν μπορεί να είναι τοξικά (Jakoby, 1978). Η τοξίνη ακρολεΐνη αποτελεί τυπικό ξενοβιοτικό υπόστρωμα τέτοιας αντίδρασης (Yousefipour *et al.*, 2005). Η ακρολεΐνη αντιδρά με την γλουταθειόνη μέσω νουκλεόφιλης προσθήκης στον άνθρακα C₂, σχηματίζοντας μια ένωση θειοαιθέρα (Εικόνα 1.21) (Horiyama *et al.*, 2016; Tacka *et al.*, 2002).



Εικόνα 1.21: Αντίδραση προσθήκης GSH στην τοξίνη ακρολεΐνη.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα ένωσης που εμπλέκεται σε αντιδράσεις προσθήκης Michael είναι το κυτοτοξικό προϊόν υπεροξειδωσής των λιπιδίων, 4-υδρόξυ-2,3-τρανσ-ενενάλη (4HNE). Το 4HNE σχηματίζει εύκολα σύμπλοκο Michael με την γλουταθειόνη, με το ένζυμο GST να επιταχύνει την αντίδραση (Singhal *et al.*, 2015). Συγκεκριμένα, οι GSTs καταλύουν τη δημιουργία συμπλόκου της γλουταθειόνης με το 4HNE μέσω προσθήκης Michael στον C₃ άνθρακα, αποτρέποντας έτσι περαιτέρω νουκλεόφιλη προσθήκη σε αυτήν την τοξική ένωση (Awasthi *et al.*, 2017; Uchida, 2003).

Ο θεμελιώδης ρόλος των GSTs είναι η κυτταρική αποτοξίνωση ενός μεγάλου εύρους ενδογενών και εξωγενών τοξικών παραγόντων (Armstrong *et al.*, 2018; Singh, 2015). Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπεροξυδάσες, ισομεράσες και θειοτρανσφεράσες (Rourke & Sinal, 2014; Jowsey *et al.*, 2003). Έτσι, οι ρόλοι τους επεκτείνονται στους μηχανισμούς του μεταβολισμού για αντιμετώπιση της καταπόνησης/στρες, στη βιοσύνθεση της προσταγλαδίνης και του λευκοτριενίου (Tossounian *et al.*, 2017; Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017; Dixon *et al.*, 2010). Κάποιοι από τους πολλαπλούς ρόλους των GSTs αναλύονται παρακάτω.

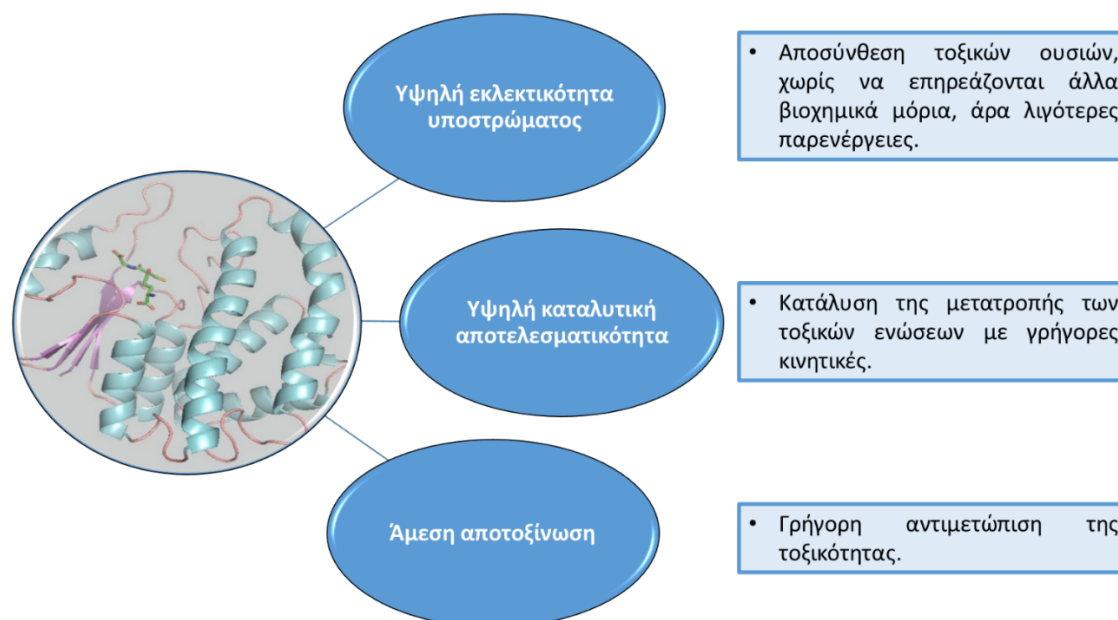
1.3.3.1 Ενζυμική αποτοξίνωση ξеноβιοτικών μέσω συμπλοκοποίησης με την GSH

Οι ζωντανοί οργανισμοί καλούνται συχνά να αντιμετωπίσουν μια σειρά από παράγοντες που ενδεχομένως να έχουν αρνητικά αποτελέσματα για τον οργανισμό, αφού μπορεί, λόγω χάριν, να είναι τοξικοί ή καρκινογόνοι παράγοντες (Ames *et al.*, 1990). Η ικανότητα των οργανισμών να διαχειρίζονται τέτοιου είδους παράγοντες και να επιβιώνουν είναι μια βιολογική προσαρμογή, θεμελιώδης για την επιβίωση τους, η οποία απαιτεί διαχείριση των τοξικών ουσιών και ονομάζεται αποτοξίνωση. Διάφορες μελέτες που σχετίζονται με την διαδικασία αποτοξίνωσης αποκαλύπτουν το δυναμικό των ενζύμων ως ιδανικών θεραπευτικών και αντιδότην, χάρη στην υψηλή εξειδίκευση που εμφανίζουν με το υπόστρωμα και στην καταλυτική τους απόδοση χωρίς να επιφέρουν επιπτώσεις στον οργανισμό (Liu *et al.*, 2015). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχουν τέσσερις μέθοδοι αποτοξίνωσης χρησιμοποιώντας ένζυμα:

- α) αποκλεισμός των υποδοχέων προκειμένου να αντιστραφούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούνται από τις τοξικές ενώσεις (Johnson *et al.*, 2000),
- β) εξουδετέρωση των τοξικών ουσιών με υψηλής συγγένειας χημικά (scavengers) (Elsinghorst *et al.*, 2013),
- γ) απορρόφηση των τοξικών με φυσικό τρόπο μέσω μεταφορέων (Hu *et al.*, 2013) και
- δ) μετατροπή των τοξικών ουσιών σε μη τοξικές (Chronopoulou *et al.*, 2017b).

Μεταξύ των τεσσάρων μεθόδων, η τελευταία είναι η προτιμότερη, γιατί αφενός παρουσιάζει τις λιγότερες παρενέργειες (Borron & Baud, 2012) και αφετέρου τα ένζυμα είναι εξαιρετικοί βιοκαταλύτες, οι οποίοι μπορούν να αποσυνθέσουν εξειδικευμένα και αποτελεσματικά αυτές τις ουσίες (Ho & Gibaldi, 2004). Σε σύγκριση με τους άλλους τρόπους αποτοξίνωσης, η χρήση των ενζύμων ως αποτοξινωτικοί παράγοντες εμφανίζουν

πολλά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή εκλεκτικότητα υποστρώματος, υψηλή καταλυτική αποτελεσματικότητα και σχετικά άμεση μέθοδος αποτοξίνωσης (Εικόνα 1.22).



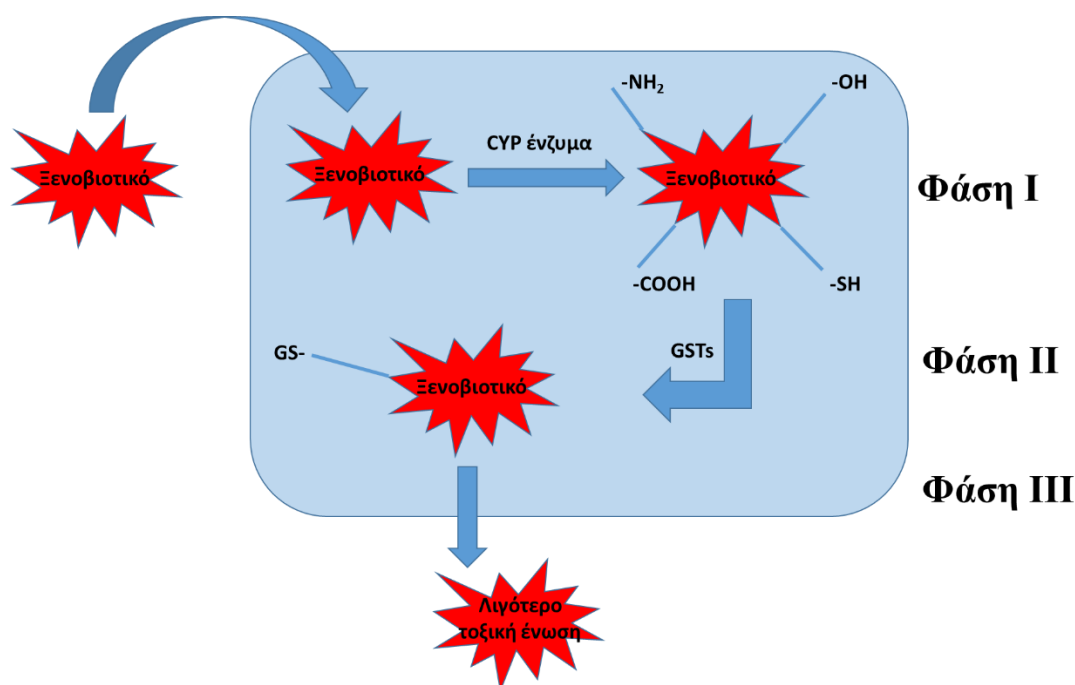
Εικόνα 1.22: Πλεονεκτήματα χρησιμοποίησης ενζύμων για την αποτοξίνωση των οργανισμών.

Τα κύτταρα, προκειμένου να προστατευθούν, χρησιμοποιούν μια σειρά από ένζυμα, τα οποία μπορούν να μετασχηματίσουν ποικιλία χημικών παραγόντων μέσα από μία διαδικασία αποτοξίνωσης η οποία πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια (Φάση I, II, III) (Εικόνα 1.23). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη βιομετατροπή των ξενοβιοτικών, τοξικών ενώσεων μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες, αυτά που οξειδώνουν και αυτά που συμπλοκοποιούν. Τα ένζυμα και των δυο ομάδων γενικά διαθέτουν μια ενεργό περιοχή, η οποία είναι ικανή να δεσμεύσει μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων (Iyanagi, 2007).

ΦΑΣΗ I : Τα ξενοβιοτικά εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα οπότε και ενεργοποιείται η διαδικασία αποτοξίνωσης. Τα ένζυμα σε αυτή τη φάση εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, εισάγοντας ηλεκτρονιόφιλες πολικές λειτουργικές ομάδες στο τοξικό μόριο (-OH, -NH₂, -SH, -COOH), ή υδρόλυσης, αποκαλύπτοντας πολικές ομάδες του ξενοβιοτικού. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην Φάση I της αποτοξίνωσης, αφού αυξάνουν την πολικότητα του τοξικού μορίου (Veith & Moorthy, 2018; Guengerich, 2017).

ΦΑΣΗ II : Οι αντιδράσεις σύζευξης σε αυτό το στάδιο οδηγούν στον σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ μιας λειτουργικής ομάδας είτε στην αρχική τοξική ένωση είτε στην ένωση που έχει προκύψει από τη φάση I της αποτοξίνωσης (Iyanagi, 2007). Ένζυμα όπως οι GSTs καταλύουν τη συμπλοκοποίηση ενεργών ξενοβιοτικών, μέσω των ηλεκτρονιόφιλων ομάδων σαν θέσεις αντίδρασης με τη GSH, δημιουργώντας έτσι ενώσεις λιγότερο τοξικές και πιο υδατοδιαλυτές (Awasthi *et al.*, 2009).

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



Εικόνα 1.23: Οι φάσεις της αποτοξίνωσης. Αρχικά, το ξενοβιοτικό εισέρχεται στο κυταρόπλασμα και στη συνέχεια, τα κατάλληλα ένζυμα σε κάθε φάση οδηγούν προς την απομάκρυνση του.

1.3.3.2 Οξειδωτική καταπόνηση και ο ρόλος των GSTs

Η GSH μπορεί να λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, καθώς επίσης ως υπόστρωμα ή συμπαραγοντας των GSTs. Ωστόσο, είναι κυρίως γνωστή για την αντιοξειδωτική της λειτουργία έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Chronopoulou *et al.*, 2011). Μικρές ποσότητες των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μπορούν να λειτουργήσουν ως μόρια μεταγωγής σήματος, ωστόσο η υψηλή συγκέντρωσή τους, γεγονός αναπόφευκτο κατά την αερόβια αναπνοή, μπορεί να οδηγήσει σε μη ελεγχόμενη οξείδωση του DNA, των πρωτεϊνών και των μεμβρανικών

λιπιδίων με αποτέλεσμα την διαταραχή του μεταβολισμού και την καταστροφή της κυτταρικής δομής (Meng *et al.*, 2017; Desikan *et al.*, 2005).

Πολλές GSTs φαίνεται να έχουν δράση υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) έναντι οργανικών υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό, χρησιμοποιώντας τα ως υποστρώματα (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017; Alias, 2016; Dixon *et al.*, 2010). Έτσι, αποδεικνύεται μια άλλη λειτουργία των GSTs, δηλαδή η προστασία του κυττάρου από ζημιές που προκαλεί η οξειδωτική καταπόνηση. Αυτή η δράση των GSTs ως GPxs αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων έναντι των υδροϋπεροξειδίων που ανήκουν στις ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS) (Kalinina *et al.*, 2014). Συγκεκριμένα, αυτή η αντίδραση εμποδίζει τον σχηματισμό κυτταροτοξικών παραγώγων αλδεϋδων από την αποικοδόμηση οργανικών υδροϋπεροξειδίων (Dixon *et al.*, 2002). Εκτός από την άμεση προστατευτική επίδραση της GPx δράσης, η αυξημένη ανοχή μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης μορφής γλουταθειόνης (GSSG), η οποία λειτουργεί ως σήμα για την ενεργοποίηση περαιτέρω προστατευτικών αντιδράσεων (Circu & Aw, 2008; Schafer & Buettner, 2001).

Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι μορφές ενεργού οξυγόνου (ROS) μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές του φυσιολογικού μεταβολισμού, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη νευρολογικών παθήσεων, καρκίνου, άσθματος και διάφορων άλλων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Araújo *et al.*, 2016; Valko *et al.*, 2007). Πράγματι, ο Sohn και οι συνεργάτες του απέδειξαν τον σημαντικό ρόλο που έχουν τα ένζυμα GSTP και GSTA στην προστασία ατόμων με άσθμα (Sohn *et al.*, 2013). Στα κύτταρα, τα υπεροξειδία μπορούν να εμφανιστούν είτε ως υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) είτε ως οργανικά υδροϋπεροξειδία, όπως λιπαρά οξέα ή φωσφολιπιδικά υδροϋπεροξειδία. Οι GSTs έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τους ιστούς και από ενδογενή οργανικά υδροϋπεροξειδία, που παράγονται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες (Alias, 2016). Πράγματι, τα ανθρώπινα ισοένζυμα GSTA1-1 και GSTA2-2 παρουσιάζουν δραστηριότητα υπεροξειδάσης γλουταθειόνης έναντι του φωσφολιπιδικού υδροϋπεροξειδίου (Hurst *et al.*, 1998).

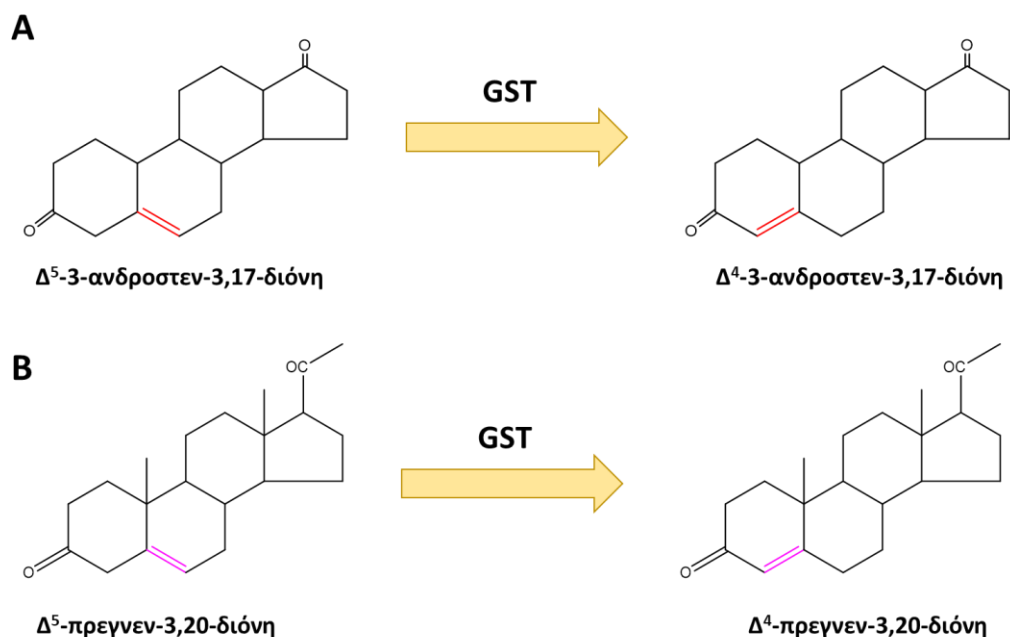
Στα φυτά, οι GPxs μπορούν να χωριστούν σε τρεις τύπους: α) τις σελινο-εξαρτώμενες GPxs που έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτά *Aloe vera*, β) τις υπεροξειδάσες γλουταθειόνης φωσφολιπιδίων, οι οποίες είναι ανεξάρτητες του σεληνίου (PHGPxs) και γ) τις

τρανσφεράσες της γλουταθειόνης με δράσης υπεροξειδάσης (Chronopoulou *et al.*, 2011). Η δράση τους έχει φανεί να αυξάνεται κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες και σε αρκετές περιπτώσεις, αυξάνει την ανοχή των φυτών (Bela *et al.*, 2015). Οι GSTs που επάγονται κατά το οξειδωτικό στρες και μετατρέπουν τα οργανικά υδροϋπεροξειδία σε μονοϋδροξυαλκοόλη, ανήκουν κυρίως στις τάξεις *theta*, *phi*, *zeta* και *tau* (Lallement *et al.*, 2014b; Pégeot *et al.*, 2014). Για παράδειγμα, τα ένζυμα GSTU19 και GSTU24 από το *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την δράση υπεροξειδάσης (Horváth *et al.*, 2015). Επίσης, τα περισσότερα ένζυμα της τάξης *phi* εμφανίζουν δράση υπεροξειδάσης (Pégeot *et al.*, 2014). Εκπρόσωποι των GSTs των τάξεων *phi* και *tau* από *Arabidopsis thaliana* εμφανίζουν υψηλή δράση υπεροξειδάσης με υδροϋπεροξειδία του λινολεϊκού οξέος (Wagner *et al.*, 2002).

1.3.3.3 Αντιδράσεις ισομερίωσης

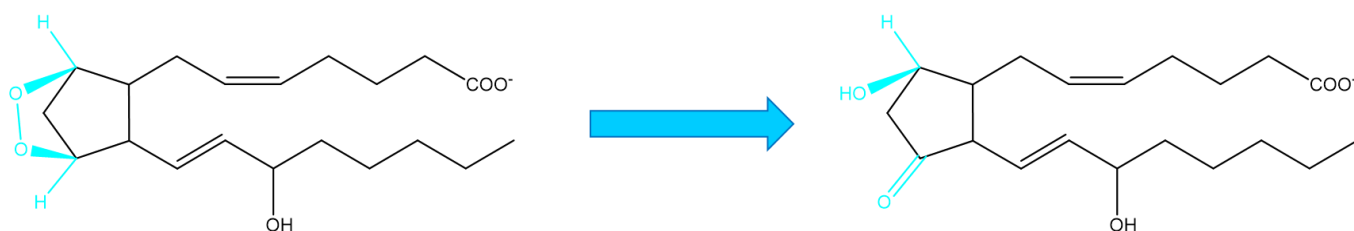
Ένας διαφορετικός ρόλος των GSTs είναι η κατάλυση αντιδράσεων ισομερίωσης βιολογικά δραστικών μορίων. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να είναι μετατοπίσεις διπλών δεσμών, ενδομοριακές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή ισομερίώσεις *cis-trans* (Deponte, 2013).

Κάποιες GSTs διαθέτουν δράση κετο-στεροϊδικής ισομεράσης και καταλύουν την μετατροπή της Δ^5 -3-ανδροστεν-3,17-διόνης (Δ^5 -AD) σε Δ^4 -3-ανδροστεν-3,17-διόνη (Δ^4 -AD) και της Δ^5 -πρεγνεν-3,20-διόνης (Δ^5 -PD) σε Δ^4 -πρεγνεν-3,20-διόνη (Δ^4 -PD). Οι ενώσεις που προκύπτουν, δηλαδή η Δ^4 -AD και η Δ^4 -PD, είναι πρόδρομες ενώσεις της τεστοστερόνης και της προγεστερόνης αντίστοιχα (Dourado *et al.*, 2014). Η αντίδραση που περιγράφεται είναι μια χαρακτηριστική αντίδραση μετατόπισης διπλού δεσμού (Εικόνα 1.24). Το ισοένζυμο A3-3 έχει φανεί ότι είναι το πιο αποτελεσματικό στην σύνθεση των παραπάνω ορμονών. Συγκεκριμένα, η GSTA3-3 από άνθρωπο και από άλογο έχουν τη υψηλότερη δράση ισομεράσης στα θηλαστικά, με δραστηρότητες που πλησιάζουν την βακτηριακή κετοστεροϊδική ισομεράση, ένα από τα αποτελεσματικότερα ένζυμα που υπάρχουν σήμερα (Lindström *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.24: Αντιδράσεις μετατόπισης διπλού δεσμού, οι οποίες καταλύονται από το ένζυμο GST. Μετατροπή A) της Δ^5 -3-ανδροστεν-3,17-διόνης (Δ^5 -AD) σε Δ^4 -3-ανδροστεν-3,17-διόνη (Δ^4 -AD) και B) της Δ^5 -πρεγνεν-3,20-διόνης (Δ^5 -PD) σε Δ^4 -πρεγνεν-3,20-διόνη (Δ^4 -PD).

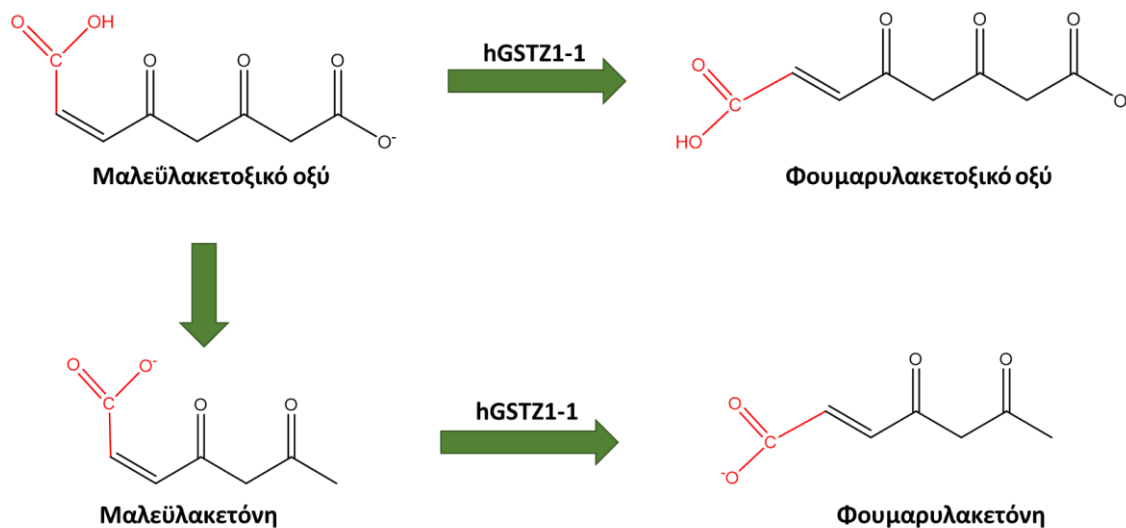
Οι προσταγλανδίνες εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες και η συνθετάση της προσταγλανδίνης διευκολύνει την αποτοξίνωση ξενοβιοτικών αλλά και ενδογενών ενώσεων μέσω της συμπλοκοποίησης με την γλουταθειόνη. Η συνθάση της προσταγλανδίνης D έχει χαρακτηριστεί ως GST ένζυμο της *sigma* τάξης και καταλύει την αντίδραση ισομερίωσης της προσταγλανδίνης H_2 σε προσταγλανδίνη D_2 , μια χαρακτηριστική ενδομοριακή αντίδραση οξειδοαναγωγής (Εικόνα 1.25) (Yamamoto *et al.*, 2017). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα ένζυμα GSTM2-2 και GSTM3-3 καταλύουν την ισομερίωση της προσταγλανδίνης H_2 σε προσταγλανδίνη E_2 (Beuckmann *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.25: Ενδομοριακή αντίδραση οξειδοαναγωγής. Μετατροπή της προσταγλανδίνης H_2 σε προσταγλανδίνη D_2 .

Οι GSTs μπορούν να καταλύουν cis-trans ισομεριώσεις, όπως για παράδειγμα την ισομερίωση του μαλεϋλακετοξικού οξέος σε φουμαρυλακετονικό οξύ. Συγκεκριμένα, το ανθρώπινο ένζυμο GST που ανήκει στην *zeta* τάξη (GSTZ1-1) παίζει ρόλο σε ένα

σημαντικό στάδιο στο μονοπάτι καταβολισμού της τυροσίνης, όπου πραγματοποιείται και η αντίδραση ισομερίωσης της μαλεΐλακετόνης προς φουμαρυλακετόνη και του μαλεΐλακετοξικού οξέος σε φουμαρυλακετοξικό οξύ (Εικόνα 1.26) (Board & Menon, 2013; Blackburn *et al.*, 1998).



Εικόνα 1.26: Αντιδράσεις cis-trans ισομερίωσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στις αντιδράσεις ισομερίωσης η GSH μπορεί α) να έχει τον ρόλο της Brønsted βάσης, δηλαδή να μπορεί να δεχτεί ένα πρωτόνιο, β) να σχηματίζει ένα σύμπλοκο GSOR, ή γ) να σχηματίζει ένα ενδιάμεσο προϊόν προσθήκης Michael (Deponte, 2013).

1.3.3.4 Γλουταθειονυλίωση

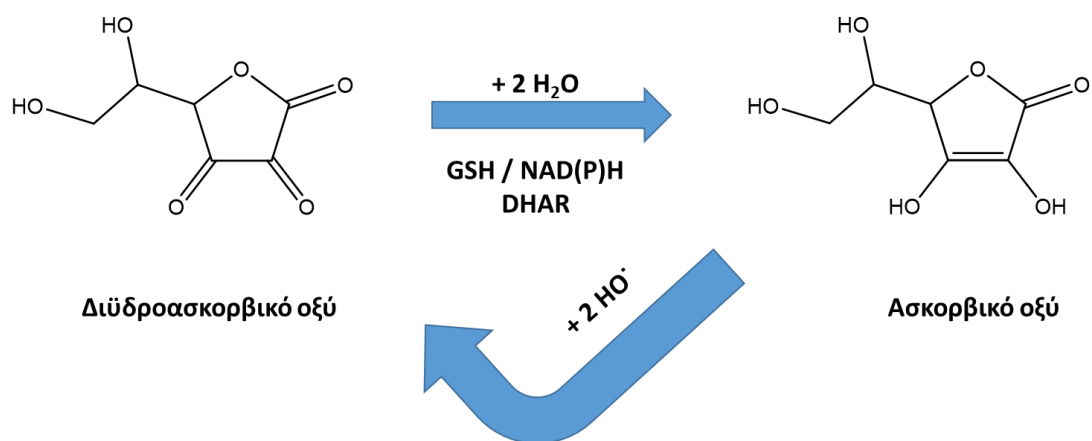
Πρόκειται για μια αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική μετα-μεταφραστική τροποποίηση, που παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος (Townsend *et al.*, 2014). Αρχικά, είχε θεωρηθεί μια διαδικασία που προστάτευε τα κατάλοιπα κυστεΐνης από την υπεροξειδωση σε σουλφενικό (RSOH), σουλφινικό (RSO₂H) ή σουλφονικό (RSO₃H) οξύ (Kreuz & Fischle, 2016), γεγονός που οδηγούσε σε αδρανοποίηση της πρωτεΐνης. Σήμερα, φαίνεται ότι συμβάλλει στη σηματοδότηση οξειδοαναγωγής και εμπλέκεται σε πολλά σημαντικά μονοπάτια (Pastore & Piemonte, 2012). Πιο συχνά, κατά την γλουταθειονυλίωση σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ της GSH και καταλοίπων κυστεΐνης (P-SSG), με αποτέλεσμα να αυξάνεται το αρνητικό φορτίο της πρωτεΐνης και έτσι να επηρεάζεται η δομή και η λειτουργία των ευαίσθητων οξειδοαναγωγικών στόχων (Townsend *et al.*, 2014; Board & Menon, 2013). Έχει αποδειχτεί ότι οι φυτικές GSTs μπορούν να ρυθμίσουν την αντιστρεπτή γλουταθειονυλίωση και θεωρείται ένας από τους προστατευτικούς

μηχανισμούς των πρωτεϊνών υπό συνθήκες στρες για την πρόληψη της οξειδωσης (Mieyal & Chock, 2012). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι GSTs από ζωικούς οργανισμούς διευκολύνουν την γλουταθειονυλίωση, συμβάλλοντας έτσι στην αντοχή των οργανισμών υπό συνθήκες στρες (Klaus *et al.*, 2013). Ωστόσο, η γλουταθειονυλίωση είναι μια διαδικασία που συμβαίνει και υπό φυσιολογικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Pastore *et al.*, 2003). Η αντίστροφη διαδικασία ονομάζεται απο-γλουταθειονυλίωση και μπορεί να συμβεί είτε μέσω αντιδράσεων ανταλλαγήςθειόλης-δισουλφιδικών δεσμών με την γλουταθειόνη, μόλις υπάρξει μια κατάλληλη αναλογία GSH/GSSG, είτε με την παρέμβαση της γλουταρεδοξίνης. Οι δυο αυτές διαδικασίες (γλουταθειονυλίωσης και απο-γλουταθειονυλίωσης) ορίζονται ως ο κύκλος της γλουταθειονυλίωσης (Pastore & Piemonte, 2012).

1.3.3.5 Δράση αναγωγής και θειομεταφοράς

Οι αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται οι GSTs περιλαμβάνουν και την αναγωγή καθώς και την θειομεταφορά. Συγκεκριμένα, οι GSTs που έχουν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στη G-θέση αντί για σερίνη δεν έχουν ανιχνεύσιμη δραστηριότητα με τα ξενοβιοτικά υποστρώματα, αλλά εμπλέκονται σε αντιδράσεις θειομεταφοράς (Csiszár *et al.*, 2016). Μέλη των τάξεων *lamda* και DHAR εμφανίζουν τέτοια δράση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το 2- υδροξυαιθύλιο δισουλφίδιο (HED) (Chronopoulou *et al.*, 2011). Η συγκεκριμένη δράση των GSTs προστατεύει τις ανηγμένες ομάδεςθειόλης στις πρωτεΐνες και ρυθμίζει την λειτουργία τους μέσω μιας διαδικασίας αντίστροφης γλουταθειονυλίωσης (Chronopoulou *et al.*, 2017).

Τα ισοένζυμα της τάξης DHAR καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του διυδροσκορβικού σε ασκορβικό οξύ χρησιμοποιώντας την GSH (Εικόνα 1.27). Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός, αφού εμπλέκονται άμεσα στην αναγέννηση του ασκορβικού οξέος, ενός βασικού αντιοξειδωτικού των φυτών υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Young *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.27: Αντίδραση αναγωγής του διϋδροασκορβικού οξέος σε ασκορβικό.

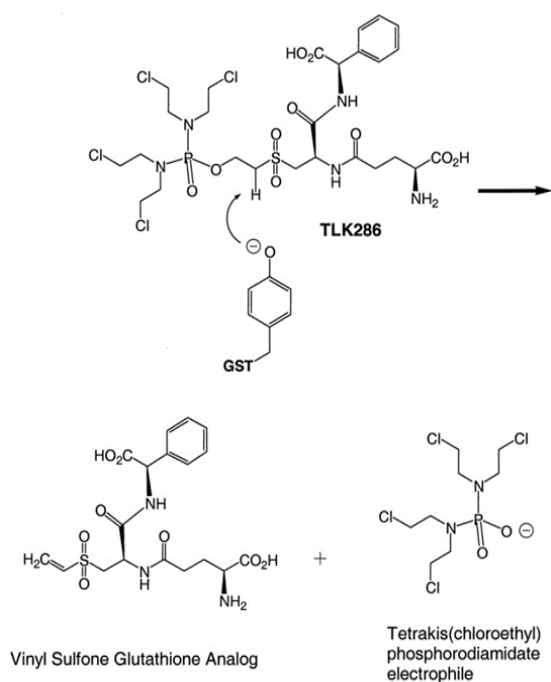
1.3.3.6 Θεραπευτική σήμανση σε ασθένειες

Τα λευκοτριένια είναι μια ομάδα βιολογικά ενεργών λιπιδικών μεσολαβητών που προέρχονται από τα C20 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Mayatepek, 2014). Έρευνες σε ινδικά χοιρίδια έδειξαν ότι όταν οι πνεύμονες διεγερθούν με αντιγόνο, απελευθερώνονται κάποιες ουσίες, τα λευκοτριένια, που συστέλλουν τους λείους μύες των βρόγχων (Kellaway & Trethewie, 1940). Η σύνθεση των λευκοτριενίων πραγματοποιείται από το αραχιδονικό οξύ της κυτταρικής μεμβράνης με τη δράση της 5-λιποξυγενάσης και μιας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί τη 5-λιποξυγενάση (Mayatepek & Hoffmann, 1995). Αρχικά, το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε ένα ασταθές μόριο, το λευκοτριένιο A₄ και στη συνέχεια μεταβολίζεται είτε σε B₄ είτε σε C₄ (Jana *et al.*, 2014; Ricardo & Sheldom, 1997; Holgate *et al.*, 1996). Για τη σύνθεση του B₄ πραγματοποιείται υδρόλυση από τη κυτταροπλασματική υδρολάση LTA₄, ενώ για να σχηματιστεί το λευκοτριένιο C₄ γίνεται συμπλοκοποίηση με τη GSH μέσω του ενζύμου συνθετάση λευκοτριενίου C₄, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των GSTs (Piper, 1984; Ford-Hutchinson, 1990). Τέλος, η τριπεπτιδική πλευρική αλυσίδα του λευκοτριενίου C₄ μπορεί να διασπαστεί σε δυο βήματα για να σχηματιστούν το LTD₄ και το LTE₄, τα οποία μαζί με την πατρική ένωση ονομάζονται κυστεϊνικά-λευκοτριένια (Cys-LTs) και ορίζονται ως τις ουσίες της αργής αντίδρασης της αναφυλαξίας (Rinaldo-Matthis & Haeggström, 2010).

Σύμφωνα με μελέτες, τα λευκοτριένια είναι υπεύθυνα για διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως ασθένειες των αεραγωγών (Pérez-Novo *et al.*, 2006), ρευματοειδή αρθρίτιδα (Shao *et al.*, 2006), αθηροσκλήρωση (Qiu *et al.*, 2006) κ.α. Άρα, κάποιοι πιθανοί τρόποι θεραπείας θα μπορούσαν να είναι η αναστολή της σύνθεσης του ενζύμου LTC₄ ή η δημιουργία ανταγωνιστών για τους υποδοχείς του LTD₄ (Rushmore & Pickett, 1993). Πράγματι, η Rossi και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι το διτερπένιο Salvinorin A, το

οποίο προέρχεται από το παραισθησιογόνο φυτό *Salvia divinorum* είναι ικανό να αναστείλει την παραγωγή των λευκοτριενίων και είναι αποτελεσματικό σε φλεγμονές που τα λευκοτριένια παίζουν σημαντικό ρόλο (Rossi *et al.*, 2016).

Η αυξημένη και διαφορετική έκφραση των ισοενζύμων των GSTs σε καρκινικά κύτταρα (Rushmore & Pickett, 1993) δείχνει τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να παίζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα στην ανθεκτικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων. Ειδικότερα, τα ισοένζυμα GSTA, GSTP, GSTM και GSTT φαίνεται να εμπλέκονται σε τέτοιες περιπτώσεις (Bertholee *et al.*, 2017). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το ισοένζυμο GSTP1-1 υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις καρκίνου, αναγνωρίζοντας τα φάρμακα (chlorambucil, cisplatin, adriamycin κ.α) σαν ξеноβιοτικά, με άμεσο αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση τους (Yang *et al.*, 2017; Chronopoulou *et al.*, 2016). Επομένως, το GSTP1-1 χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος ενεργοποίησης προφαρμάκων. Ένα τέτοιο προφάρμακο είναι το TLK286. Πρόκειται για ένα φάρμακο κατά του καρκίνου που σχεδιάστηκε για να στοχεύσει το ισοένζυμο GSTP1-1 (Rosen *et al.*, 2003). Η έκθεση των κυττάρων στο συγκεκριμένο φάρμακο προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Meng *et al.*, 2001). Αυτό διασπάται μέσω μιας αντίδρασης β-απόσπασης σε ένα προϊόν που αποτελεί το τελικό αλκυλιωτικό μόριο και σε ένα ανάλογο της GSH, ύστερα από το μεταβολισμό του από το ένζυμο GSTP1-1 (Nissar *et al.*, 2017; Townsend & Tew, 2003) (Εικόνα 1.28). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το TLK286 δρα μέσω ενός νέου αποπτωτικού μηχανισμού που επάγει το μονοπάτι της απόκρισης του στρες (Rosen *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.28: Χημική δομή του προφαρμάκου TLK286.

Πέρα από το ένζυμο GSTP, το ένζυμο GSTM έχει επίσης μελετηθεί εκτενώς ως προς τη σχέση που έχει σχετικά με την ευπάθεια των ατόμων να εμφανίσουν καρκίνο, εξαιτίας της υψηλής πολυμορφικότητας που εμφανίζει (Rose *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι στα άτομα, στα οποία εκφράζεται το GSTM, προστατεύονται καλύτερα έναντι διάφορων καρκινογόνων παραγόντων. Το GSTM συνδέεται με ισχυρά καρκινογόνους μεταβολίτες που παράγονται κατά το κάπνισμα (Rao *et al.*, 2017). Επομένως, θεωρητικά, είτε η ύπαρξη είτε η απουσία του συγκεκριμένου ενζύμου μπορεί να καθορίσει την ευαισθησία ενός ατόμου στην εμφάνιση καρκίνου εξ αιτίας του καπνίσματος (Hayes & Strange, 2000; Spirakou *et al.*, 1996; Strange, 1993).

1.3.4 Μη καταλυτικός ρόλος των GSTs

1.3.4.1 Οι GSTs και ο ρόλος τους ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης

Οι GSTs, πέρα από τους καταλυτικούς τους ρόλους, μπορούν να λειτουργήσουν και σαν πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης (ligandin πρωτεΐνες) τόσο για εξωγενή όσο και για ενδογενή υποστρώματα (Sheehan *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι GSTs μπορούν να δεσμεύσουν αντιστρεπτά αρκετά υδρόφοβα υποστρώματα όπως η αίμη, λιπαρά οξέα, στεροειδή, ορμόνες (αυξίνη, κυτοκίνη), αζωχρώματα, φλαβονοειδή (κερσετίνη, καμφερόλη), χολερυθρίνη κ.α, τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματά των GSTs (Dixon *et al.*, 2010; Dixon & Edwards, 2009, 2010; Hayes *et al.*, 2005). Οι ουσίες αυτές δεσμεύονται σε μια ξεχωριστή θέση του πρωτεϊνικού μορίου, την L-θέση, η τοποθεσία της οποίας διαφέρει σε κάθε ισόενζυμο (Chronopoulou *et al.*, 2017). Βιοφυσικές και βιοχημικές έρευνες έχουν δείξει ότι αυτή η θέση μπορεί να βρίσκεται είτε στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περιφερικά του διμερούς, όπως στην περίπτωση του ενζύμου GSTU4-4 από σόγια (Axarli *et al.*, 2009a), είτε μέσα στο διμερές (Ahmad *et al.*, 2016), είτε να επικαλύπτει την G- ή την H-θέση, όπως στην περίπτωση του φυτού *Arabidopsis thaliana*, που βρίσκεται δίπλα στην G-θέση (Reinemer *et al.*, 1996). Το ένζυμο GSTF2 από το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη πρόσδεσης των δευτερογενών μεταβολιτών καμαλεξίνη και κερσετίνη. Η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου επάγεται ύστερα από προσβολή από παθογόνα και σχετίζεται με τα κυστίδια μεμβράνης, μια ένδειξη που εμπλέκεται στη μεταφορά των δευτερογενών μεταβολιτών σχετικών με την άμυνα (Kumar, 2014). Ο Ahmad και οι συνεργάτες του, βασισμένοι στην κρυσταλλογραφία, απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο AtGSTF2 έχει δυο L-θέσεις, εκ των οποίων η μια βρίσκεται περιφερικά του διμερούς και η άλλη μέσα στο διμερές (Ahmad *et al.*, 2016).

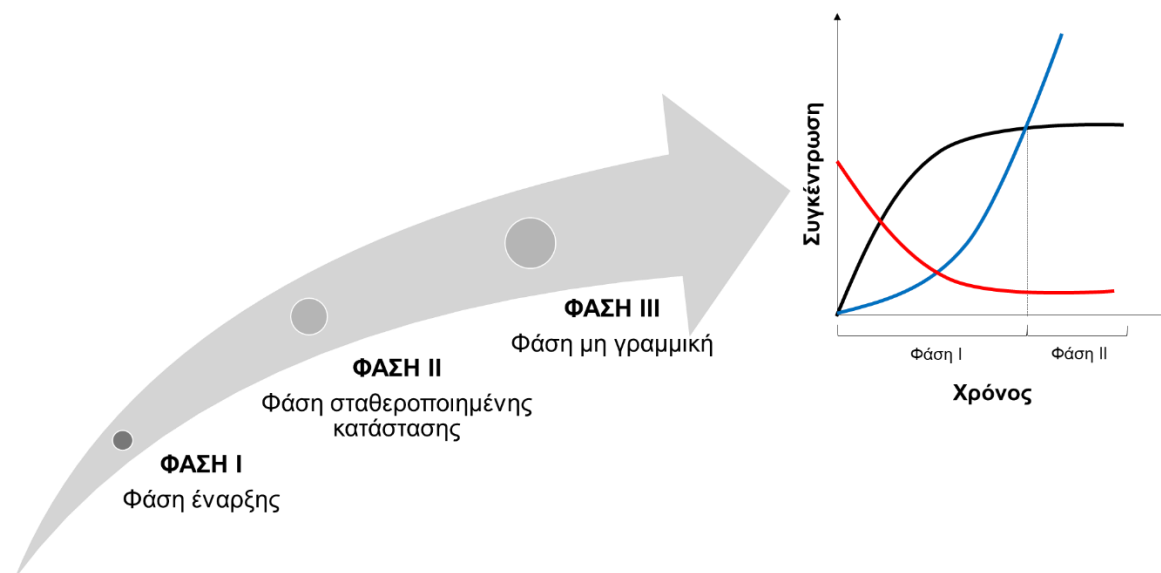
Ωστόσο, το *AtGSTF2* δεν παρουσιάζει καταλυτική δραστηριότητα μεταξύ της γλουταθειόνης και των ενώσεων, οι οποίες προσδένονται στην L-θέση, άρα φαίνεται να λειτουργεί αποκλειστικά ως πρωτεΐνη-μεταφορέας (Chronopoulou *et al.*, 2017). Ένα άλλο παράδειγμα για αυτήν την λειτουργία αποτελεί το ένζυμο GSTU1 από αραβόσιτο, το οποίο μπορεί να δεσμεύσει πορφυρογόνα. Τα πορφυρογόνα βρίσκονται στον χλωροπλάστη, ωστόσο υπό συνθήκες στρες ή γήρανσης διαρρέουν στο κυτταρόπλασμα και ύστερα από οξείδωση παράγεται η λιπόφιλη και φυτοτοξική πρωτοπορφυρίνη (Dixon *et al.*, 2011). Οι GSTs όταν προσδεθούν στα πορφυρογόνα, που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζουν την αυτόματη οξείδωση, με αποτέλεσμα το φυτό να προστατεύεται (Lederer & Boger, 2003). Επίσης, τα ένζυμα της *tau* τάξης του φυτού *Arabidopsis thaliana* εμπλέκονται στην δέσμευση της οξυλιπίνης (Dixon & Edwards, 2009). Πρόκειται για υποπροϊόντα της οξείδωσης λιπιδίων, τα οποία λειτουργούν ως σινιάλα για την προσαρμογή σε συνθήκες στρες άλλα και ως πρόδρομες ενώσεις στη βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος (Hou *et al.*, 2016). Ο πιθανότερος ρόλος των GSTs στη βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος είναι η μεταφορά της οξυλιπίνης 12-οξο-φυτοδιενοϊκού οξέος από τον χλωροπλάστη στο περοξύσωμα, όπου πραγματοποιείται η σύνθεση (Dixon & Edwards, 2009).

Οι βασικοί ρόλοι αυτής της μη καταλυτικής λειτουργίας των GSTs φαίνεται να είναι κυρίως η διευκόλυνση της μεταφοράς αυτών των ουσιών μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων καθώς επίσης και η αποθήκευσή τους (Chronopoulou *et al.*, 2017; Lallement *et al.*, 2014a).

1.3.5 Κινητική αντίδρασης των ενζύμων

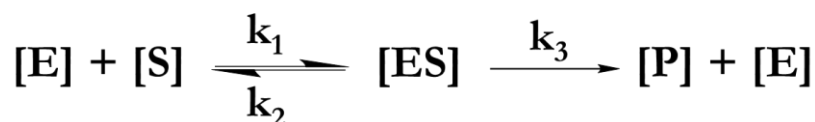
Ο ρόλος των ενζύμων είναι να δρουν καταλυτικά σε μια αντίδραση, δηλαδή να μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη του σημείου ισορροπίας της αντίδρασης. Τα ένζυμα δεν τροποποιούνται με τρόπο μη αναστρέψιμο και αυτό επιτυγχάνεται δεσμεύοντας το ή τα υποστρώματα σε μια κοιλότητα που ονομάζεται ενεργός περιοχή. Ουσιαστικά, τα ένζυμα φέρνουν το υπόστρωμα σε κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να σχηματιστεί το μεταβατικό σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Η αντίδραση παρουσία ενζύμου διακρίνεται σε τρεις φάσεις: α) έναρξης (Φάση I), β) σταθεροποιημένης κατάστασης (Φάση II) και γ) μη γραμμική (Φάση III) (Εικόνα 1.25). Κατά την Φάση I, δημιουργείται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (Brown, 1902; Henri, 1903), το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε προϊόν και σε αρχικό ένζυμο (Εικόνα 1.30). Η δημιουργία του συμπλόκου είναι αντιστρεπτή διαδικασία και ενεργειακά βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το υπόστρωμα

και το ένζυμο. Η μετατροπή του συμπλόκου σε προϊόν και ελεύθερο ένζυμο είναι μια διαδικασία εξώθερμη και μη αντιστρεπτή, και θεωρείται ότι ελέγχει την ταχύτητα της ολικής αντίδρασης, δηλαδή είναι το καθοριστικό στάδιο (rate-limiting step).



Εικόνα 1.29: Οι τρεις φάσεις της ενζυμικής αντίδρασης και το γράφημα, που παρουσιάζει την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης (συγκέντρωση σε συνάρτηση με τον χρόνο). Παρουσιάζονται η φάση έναρξης (Φάση I) και η φάση σταθεροποιημένης κατάστασης (Φάση II). Με **μαύρο** χρώμα εμφανίζεται η **συγκέντρωση** του **συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος**, με **μπλε** η **συγκέντρωση** του **προϊόντος**, ενώ με **κόκκινο** η **συγκέντρωση** του **ελεύθερου ενζύμου**.

Κατά την Φάση II, τα αντιδρώντα συστατικά βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και το σύστημα λειτουργεί σε σταθεροποιημένη μορφή. Χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης φάσης είναι η γραμμική εξάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε συνάρτηση με τον χρόνο. Τέλος, κατά την Φάση III, μειώνεται σταδιακά η αρχική ταχύτητα και αποτελεί ένδειξη της μείωσης της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Εικόνα 1.30: Πρότυπο ισορροπίας. [E]: συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου, [S]: συγκέντρωση του υποστρώματος, [ES]: συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, [P]: συγκέντρωση του προϊόντος και k_1 , k_2 , k_3 : σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων.

Το 1913, ο Michaelis και η Menten επιβεβαίωσαν αυτό το απλό πρότυπο (Εικόνα 1.26) και διατύπωσαν την θεωρία της σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state). Έτσι, η σχέση που περιγράφει την κατάσταση της ενζυμικής κινητικής της Φάσης II διαμορφώνεται ως εξής:

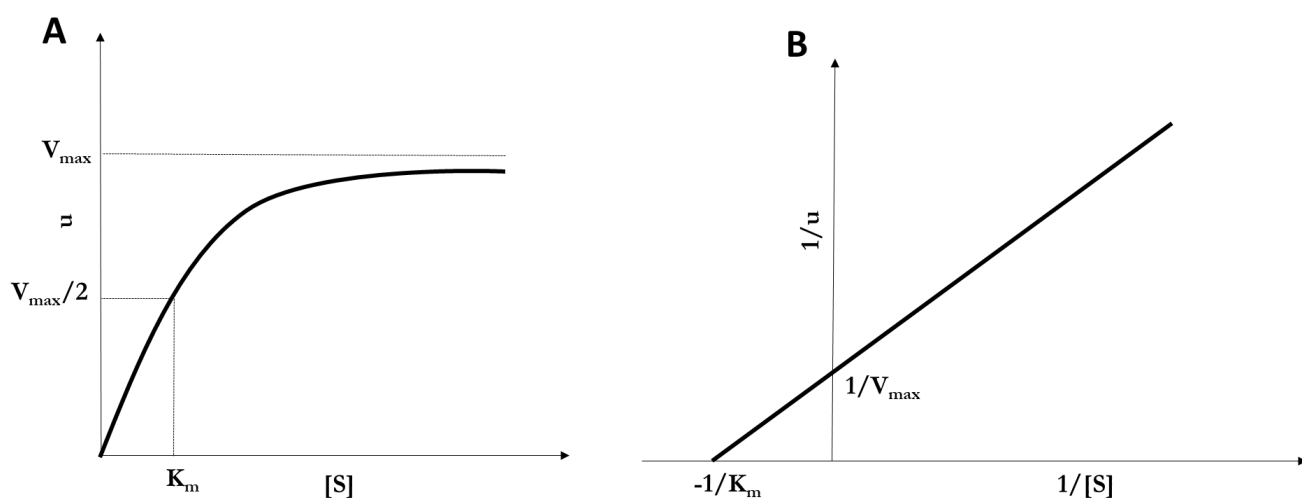
$$u = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m}$$

, όπου u είναι η ταχύτητα συνολικής αντίδρασης, V_{\max} είναι η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης, $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος και K_m είναι η σταθερά Michaelis.

Η γραφική παράσταση της ταχύτητας σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του υποστρώματος των Michaelis-Menten είναι ορθογώνια υπερβολή (Εικόνα 1.31A)

Η σταθερά K_m αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα (Johnson, 2013). Συγκεκριμένα, όσο μικρότερη είναι η τιμή της σταθεράς, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια.

Προκειμένου να υπολογιστούν οι K_m και V_{\max} , χρησιμοποιείται η γραφική παράσταση διπλών αντιστρόφων, γνωστή ως παράσταση των Lineweaver και Burk. Η κλίση της ευθείας που προκύπτει είναι ίση με K_m/V_{\max} , το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα των τεταγμένων ισούται με $1/V_{\max}$ ενώ το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα των τετημένων ισούται με $-1/K_m$ (Εικόνα 1.31B).



Εικόνα 1.31: Γραφική παράσταση Michaelis-Menten (A) και Lineweaver-Burk (B).

Η σταθερά καταλύσεως (k_{cat}) είναι ένα μέτρο της κινητικής αντίδρασης, το οποίο εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που καταλύονται ανά μονάδα χρόνου από ένα ενζυμικό μόριο. Ισούται δηλαδή με τον λεγόμενο αριθμό μετατροπής ή ανακυκλίσεως του ενζύμου (Davidi & Milo, 2017). Οι τιμές της σταθεράς καταλύσεως μπορεί να κυμαίνονται από τιμές πολύ χαμηλές έως και πολύ υψηλές και υποδεικνύουν την ικανότητα της ενεργού περιοχής να λειτουργεί με χαμηλή ή υψηλή ταχύτητα καταλύσεως (Κλώνης, 2007).

Το πιο σημαντικό μέτρο της αποτελεσματικότητας του ενζύμου ονομάζεται σταθερά εξειδικεύσεως (K_A) και ορίζεται ως ο λόγος k_{cat}/K_m για κάθε ένζυμο (Johnson, 2013). Τα ένζυμα των οποίων η σταθερά εξειδικεύσεως είναι στα ανώτατα όρια έχουν επιτύχει κινητική τελειότητα (π.χ ακετυλοχολινεστεράση, δισμουτάση του υπεροξειδίου).

Η υπόθεση της ταχείας ισορροπίας των Michaelis-Menten χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις ενζύμων, ωστόσο πρέπει να υπάρχουν κάποιες προϋποθέσεις. Πρώτον, η ενζυμική αντίδραση πρέπει να είναι ψευδο-μόνο-υποστρωματική ή πολυ-υποστρωματική στην οποία όμως οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων πρέπει να διατηρούνται σταθερές, εκτός από μια. Δεύτερον, το ένζυμο πρέπει να έχει μια περιοχή δέσμευσης υποστρώματος ή αν έχει περισσότερες να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Σε περιπτώσεις συνέργειας και αλλοστερισμού, ακολουθείται άλλο πρότυπο κινητικής. Τέλος, πρέπει να σχηματίζεται μόνο ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο ή και δεύτερο, αρκεί να περιορίζει και να ελέγχει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης. Πέρα από το παραπάνω πρότυπο, υπάρχει και η υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης των Briggs και Haldane. Η θεωρία των Briggs & Haldane συχνά αναφέρεται και ως η αντιστρεπτή κινητική των Michaelis-Menten (Noor *et al.*, 2013; Briggs & Haldane, 1925).

Το πρότυπο κινητικής των Michaelis-Menten, ωστόσο, δε μπορεί να εξηγήσει την κινητική συμπεριφορά όλων των ενζύμων. Το γεγονός αυτό έγινε αντιληπτό στο τέλος της δεκατίας του '50, όταν ανακαλύφθηκαν ένζυμα όπως η απαμινάση της θρεονίνης, τα οποία δεν ακολουθούσαν την κινητική των Michaelis-Menten, άλλα εμφάνιζαν μια σιγμοειδή καμπύλη. Ωστόσο, ήταν ήδη γνωστό ότι η πρόσδεση του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη δεν ακολουθεί την κλασική κινητική, αλλά μια σιγμοειδή καμπύλη, η οποία είχε περιγραφεί από τον Hill το 1910. Η συγκεκριμένη κινητική συμπεριφορά ήταν αποτέλεσμα της συνέργειας κατά την δέσμευση του υποστρώματος (Cárdenas, 2014). Επίσης, τα αλλοστερικά ένζυμα, τα οποία αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα, ακολουθούν το ίδιο πρότυπο κινητικής. Σε περιπτώσεις αλλοστερισμού,

χρησιμοποιείται το πρότυπο του Hill. Η γραφική παράσταση που εμφανίζουν τέτοια ένζυμα είναι μια σιγμοειδής καμπύλη, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Σε αυτές τις περιπτώσεις ενζύμων, η πρόσδεση ενός υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων του ίδιου ενζύμου. Υπάρχει δηλαδή συνέργεια, αφού η πρόσδεση ενός υποστρώματος μπορεί να διευκολύνει ή να παρεμποδίσει την πρόσδεση σε άλλα ενεργά κέντρα. Προκειμένου να βρεθεί ο τρόπος συνέργειας υπάρχει ο συντελεστής του Hill (n). Όταν το $n=1$, δεν υπάρχουν φαινόμενα συνέργειας. Όταν $n>1$, υπάρχει θετική συνέργεια, ενώ για $n<1$ λειτουργεί φαινόμενο αρνητικής συνέργειας (Weiss, 1997). Η συνέργεια, θετική ή αρνητική, υποδεικνύει αν η δέσμευση ενός μορίου αυξάνει ή μειώνει την συγγένεια μιας άλλης θέσης δέσμευσης του ενζύμου για τον δεσμευτή.

Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα αντίδρασης είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του ενζύμου και το pH. Ιδιαίτερη έρευνα στην σημασία του pH πραγματοποίησε ο Michaelis, ενώ οι Henry & Brown υποστήριζαν ότι η ρύθμιση της οξύτητας δεν ήταν αναγκαία (Cornish-Bowden, 2013).

Σχετικά με τα ένζυμα που δεσμεύουν δυο υποστρώματα, η κατάσταση είναι λίγο πιο περίπλοκη. Υπάρχει το σύστημα Bi Bi, στο οποίο υπάρχουν τρεις πιθανοί μηχανισμοί, υποχρεωτικής ή τυχαίας διαδοχής και μηχανισμός πιγκ πονγκ (Cleland, 1963). Στον μηχανισμό υποχρεωτικής διαδοχής, πρέπει να δεσμευτεί πρώτα το ένα υπόστρωμα και μετά το άλλο, ενώ στην τυχαία διαδοχή τα υποστρώματα δεσμεύονται στο ένζυμο με τυχαίο τρόπο και τυχαία απελευθερώνονται τα προϊόντα. Όσον αφορά στο μηχανισμό πιγκ πονγκ, πρέπει πρώτα να απελευθερωθεί το προϊόν του πρώτου υποστρώματος και μετά να προσδεθεί το δεύτερο υπόστρωμα (Garrett & Grisham, 2010). Οι GSTs ακολουθούν κάποιον από τους μηχανισμούς του Bi Bi συστήματος (Labrou *et al.*, 2001; Cleland, 1963).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι GSTs επιτυγχάνουν την κατάλυση μέσω της συμμετοχής ενός αμινοξέος, το οποίο αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί την σουλφυδρυλομάδα της GSH για να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό θειολικό ανιόν (Gupta *et al.*, 2011). Αυτό το καταλυτικό αμινοξύ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, διαφέρει ανάλογα με την τάξη. Πιο συγκεκριμένα, ισοένζυμα της *άλφα*, *μι*, *πι* και *σίγμα* τάξης έχουν την τυροσίνη, ισοένζυμα της *δέλτα*, *έψιλον*, *θήτα*, *ταυ* και *ζήτα* τάξης έχουν την σερίνη και τέλος ισοένζυμα της *ωμέγα*, *βήτα* και *λάμδα* έχουν την κυστεΐνη (Skopelitou *et al.*, 2012). Ωστόσο, στην κατάλυση

συμμετέχουν και άλλα αμινοξέα. Αλλαγές αυτών των αμινοξέων μπορεί να επηρεάσουν τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Οι Labrou και οι συνεργάτες του (2001) μελέτησαν τις διαφορές που εμφανίζει το ένζυμο GST I από αραβόσιτο, έπειτα από την αλλαγή του συντηρημένου αμινοξέος ασπαραγίνη (Asn49). Οι ερευνητές απέδειξαν ότι το μεταλλαγμένο ένζυμο υπακούει διαφορετικό κινητικό πρότυπο από τον άγριο τύπο, ο οποίος ακολουθεί την υπόθεση ταχείας ισορροπίας (Labrou *et al.*, 2001). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν και άλλα πειράματα με τα οποία αποδεικνύεται ότι αλλαγές στα αμινοξέα του ενεργού κέντρου προκαλούν διαφορές στα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου (Skopelitou *et al.*, 2012; Labrou *et al.*, 2004).

1.3.6 Αναστολή των ενζύμων

Η δραστηριότητα των ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από διάφορες ενώσεις. Τέτοιες ενώσεις ονομάζονται αναστολείς ή παρεμποδιστές και το φαινόμενο που προκαλούν, αναστολή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αναστολή οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με μια ένωση-αναστολέα. Ωστόσο, υπάρχουν και οι σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες αναστολέας μπορεί να είναι είτε το υπόστρωμα είτε το προϊόν. Υπάρχουν δυο είδη αναστολέων, οι αντιστρεπτοί και οι μη αντιστρεπτοί. Ένας αντιστρεπτός αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο με τέτοιο τρόπο, ώστε αυτό να μπορεί να ανακτήσει την δραστηριότητα του, σε αντίθεση με έναν μη αντιστρεπτό αναστολέα, ο οποίος αδρανοποιεί πλήρως το ένζυμο.

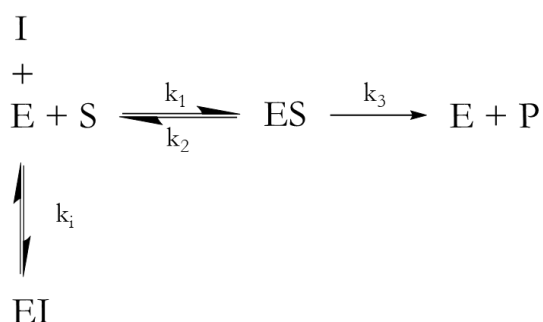
Το είδος αναστολής που επιφέρει κάθε ένωση αλλά και ο τρόπος που αλληλεπιδρά με το ένζυμο μπορούν να κατανοηθούν μέσω της κινητικής μελέτης του ενζύμου παρουσία της ένωσης. Όλοι οι αναστολείς (αντιστρεπτοί ή μη αντιστρεπτοί) επηρεάζουν αρνητικά την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και συνεπώς την ενζυμική δραστηριότητα. Το ένζυμο εξακολουθεί να υπακούει στην κλασική κινητική των Michaelis-Menten, όμως οι σταθερές ενζυμικής αντίδρασης (K_m , V_{max} , k_{cat} , k_A) αποκτούν νέες φαινομενικές τιμές (K_m^{app} , V_{max}^{app} , K_{cat}^{app} , k_A^{app}) (Cornish-Bowden, 2014).

Τα κύρια είδη ενζυμικής αναστολής είναι τα εξής:

- Συναγωνιστική αναστολή
- Μικτή αναστολή και
- Ανταγωνιστική αναστολή

1.3.6.1 Συναγωνιστική αναστολή

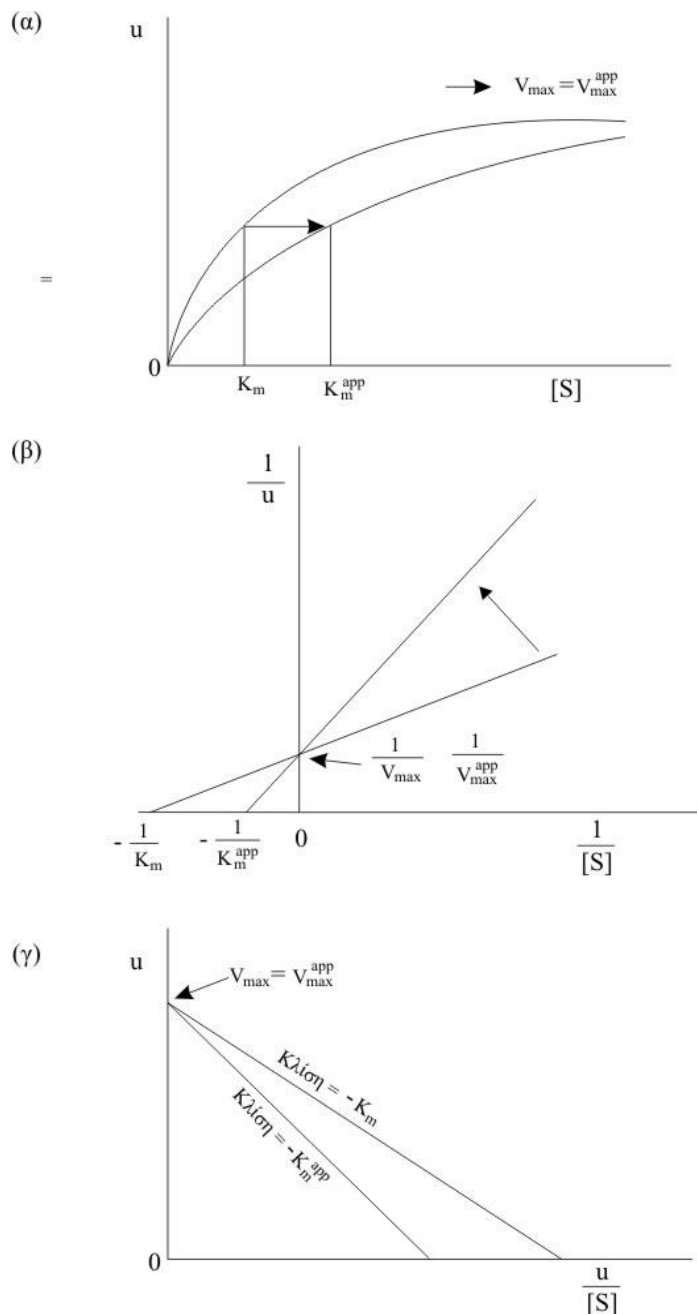
Στην συναγωνιστική αναστολή, επηρεάζεται η σταθερά εξειδικεύσεως k_A , ενώ παραμένει ανέπαφη η σταθερά καταλύσεως k_{cat} . Ο αναστολέας (I) και το υποστρώμα (S) συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο (E). Επομένως, η δέσμευση του ενός αποκλείει την ταυτόχρονη δέσμευση του άλλου, χωρίς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



Εικόνα 1.32: Πρότυπο ισορροπίας της συναγωνιστικής αναστολής (Κλώνης, 2007).

Η σχέση που περιγράφει την κατάσταση της ενζυμικής κινητικής κατά τη Φάση II ονομάζεται εξίσωση της ταχύτητας αντίδρασης υπό συναγωνιστική αναστολή και διαμορφώνεται ως εξής:

$$u = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}$$



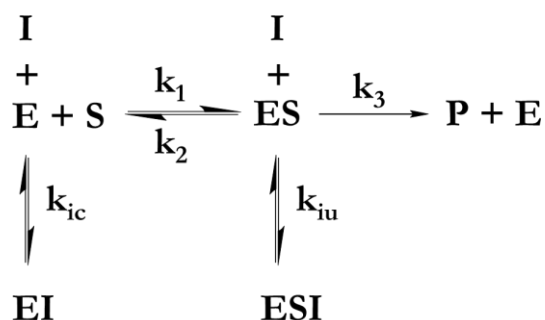
Εικόνα 1.33: Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης u συναρτήσει της συγκεντρώσεως υποστρώματος $[S]$ απουσία και παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα. (α) Κλασσική Michaelis-Menten (ορθογώνια υπερβολή), (β) Διπλών αντιστρόφων (ευθεία), (γ) Hofstee

Βάσει της εξίσωσης που διαμορφώνεται υπό συναγωνιστική αναστολή, φαίνεται ότι η φαινομενική σταθερά K_m^{app} αυξάνεται, ενώ η φαινομενική σταθερά εξειδικεύσεως k_A^{app} μειώνεται. Αποτέλεσμα της συναγωνιστικής αναστολής είναι η μείωση της φαινομενικής συγγένειας και εξειδίκευσης του ενζύμου έναντι του υποστρώματος.

1.3.6.2 Μικτή αναστολή

Η μικτή αναστολή συνδυάζει την συναγωνιστική και την ανταγωνιστική αναστολή. Στη μικτή αναστολή, χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι μεταβάλλονται όλες οι κινητικές σταθερές k_{cat} , k_A και K_m . Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε

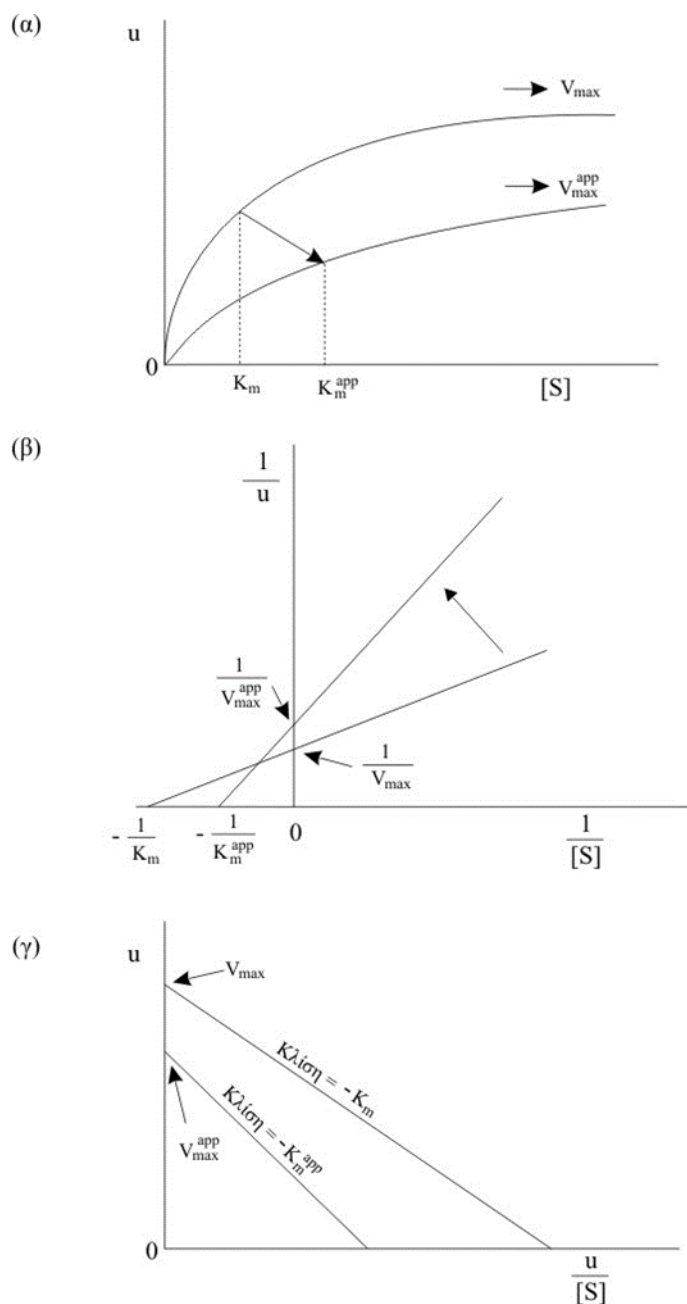
διαφορετική θέση από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο.



Εικόνα 1.34: Πρότυπο ισοροπίας στη μη συναγωνιστική αναστολή (Κλώνης, 2007)

Σε αυτό το είδος αναστολής, η φαινομενική καταλυτική σταθερά και η φαινομενική σταθερά εξειδικεύσεως μειώνονται, ενώ η σταθερά K_m εξαρτάται από τις σταθερές αναστολής k_{ic} και k_{iu} . Πιο συγκεκριμένα, όταν $k_{ic} < k_{iu}$, η φαινομενική σταθερά K_m είναι μεγαλύτερη από την αρχική, ενώ όταν $k_{ic} > k_{iu}$, η φαινομενική σταθερά K_m είναι μικρότερη. Το γεγονός αυτό φαίνεται και στην εξίσωση της ταχύτητας αντιδράσεως υπό μικτή αναστολή, όπου:

$$u = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} [S]}{[S] + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}}$$



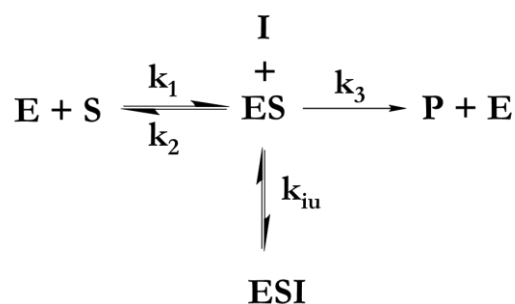
Εικόνα 1.35: Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως u συναρτήσει της συγκεντρώσεως υποστρώματος $[S]$ απουσία και παρουσία μικτού αναστολέα $k_{ic} < k_{iu}$. (α) Κλασσική Michaelis-Menten (ορθογώνια υπερβολή), (β) Διπλών αντιστροφών (ευθεία), (γ) Hofstee (ευθεία) (Κλώνης, 2007).

Μια υποπερίπτωση μικτής αναστολής είναι η *μη συναγωνιστική αναστολή*, όπου οι σταθερές αναστολής k_{ic} και k_{iu} είναι ίσες. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας προσδένεται τόσο στο ελεύθερο ένζυμο όσο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και μειώνει την φαινομενική καταλυτική σταθερά και τη σταθερά εξειδικεύσεως, ωστόσο δε

μεταβάλλει την τιμή της φαινομενικής σταθεράς K_m . Σε αυτήν την περίπτωση αναστολής, η φαινομενική καταλυτική δραστηριότητα και εξειδίκευση του ενζύμου μειώνεται, ενώ η φαινομενική συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα δεν επηρεάζεται.

1.3.6.3 Ανταγωνιστική αναστολή

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

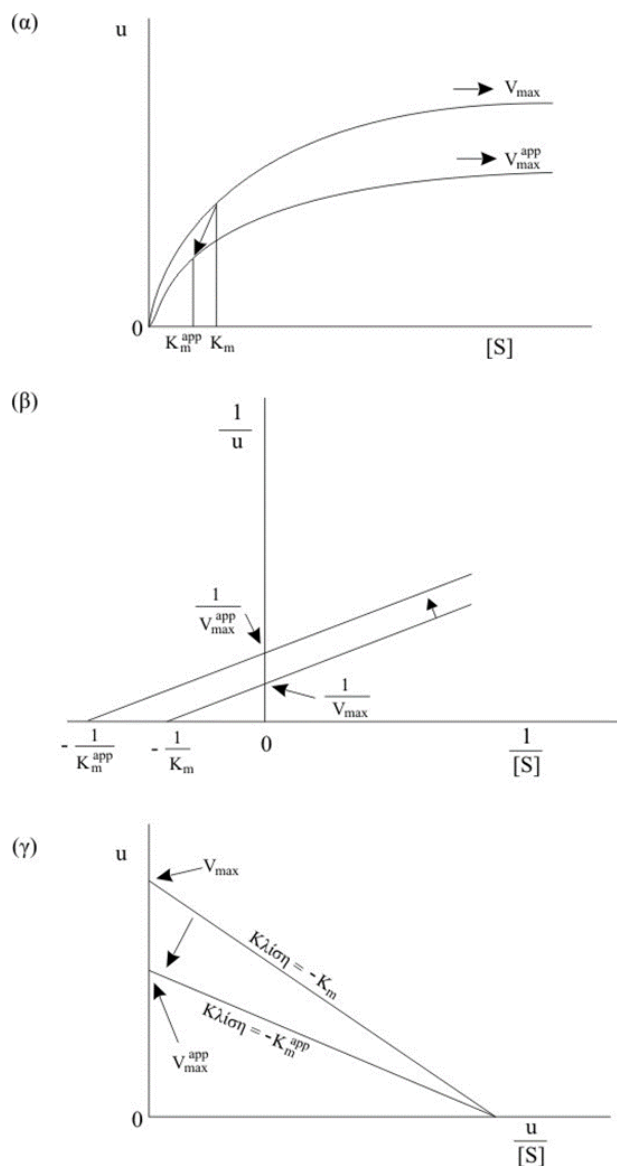


Εικόνα 1.36: Πρότυπο ισοροπίας στη ανταγωνιστική αναστολή (Κλώνης, 2007)

Ουσιαστικά, η ανταγωνιστική αναστολή είναι το αντίθετο της συναγωνιστικής, αφού ο αναστολέας δε μπορεί να προσδεθεί στο ελεύθερο ένζυμο, άλλα μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, εν αντιθέσει με την συναγωνιστική όπου ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο στο ελεύθερο ένζυμο. Είναι ο πιο σπάνιος τύπος αναστολής, γιατί συνήθως οι ενώσεις που προσδέονται στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με το ελεύθερο ένζυμο.

Σύμφωνα με την εξίσωση της ταχύτητας αντιδράσεως υπό ανταγωνιστική αναστολή, η φαινομενική σταθερά K_m και η φαινομενική σταθερά καταλύσεως μειώνονται, ενώ η φαινομενική σταθερά εξειδικεύσεως παραμένει αμετάβλητη. Έτσι, ένας ανταγωνιστικός αναστολέας αυξάνει τη φαινομενική συγγένεια του ενζύμου έναντι του υποστρώματος και μειώνει τη ταχύτητα καταλύσεως, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την εξειδίκευση.

$$u = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} [S]}{[S] + \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}}$$



Εικόνα 1.37: Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως u συναρτήσει της συγκεντρώσεως υποστρώματος $[S]$ απουσία και παρουσία ανταγωνιστικού αναστολέα. (α) Κλασσική Michaelis-Menten (ορθογώνια υπερβολή), (β) Διπλών αντιστρόφων (ευθεία), (γ) Hofstee (ευθεία) (Κλώνης, 2007).

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

Όσον αφορά στις GSTs, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες αναστολής τους από διάφορες ενώσεις. Ο βασικότερος λόγος εκτενούς μελέτης είναι ότι κάποιοι εκπρόσωποι

των συγκεκριμένων ενζύμων εμποδίζουν την δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Ειδικότερα, το ισοένζυμο GSTA έχει φανεί να συσχετίζεται με καρκίνο του γαστρικού ιστού, καθώς επίσης και αντοχή στο αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin (Kodera *et al.*, 1994). Έτσι, η Koutsoumpli και οι συνεργάτες της μελέτησαν την αναστολή του ισοενζύμου hGSTA1-1 από κάποια παράγωγα πυρρόλης (Koutsoumpli *et al.*, 2012). Το ίδιο ισοένζυμο μελετήθηκε έναντι μιας βιβλιοθήκης ξανθονών (Zoi *et al.*, 2013), καθώς επίσης και παραγώγων τους, τις βενζοφαινόνες (Perperopoulou *et al.*, 2014), προκειμένου να βρεθούν καινούριοι αναστολείς. Επιπλέον, το GSTP1 έχει μελετηθεί πάρα πολύ λόγω της συμμετοχής του στο σύστημα αποτοξίνωσης σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου προσδίδει ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα και επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων. Για τον λόγο αυτόν, η Ρουλιού και οι συνάδελφοι της μελέτησαν την αναστολή του από την ίδια βιβλιοθήκη βενζοφαινονών, προκειμένου να βρεθούν προφάρμακα ή ενώσεις-οδηγοί για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων (Pouliou *et al.*, 2015). Ένα ακόμα ισοένζυμο που σχετίζεται με διάφορους τύπους καρκίνου είναι το GSTM1-1, το οποίο μελετήθηκε έναντι της ίδιας βιβλιοθήκης ενώσεων προκειμένου να βρεθεί κάποιος πιθανός αναστολέας (Georgakis *et al.*, 2017).

1.3.7 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις και GSTs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο βασικός ρόλος των GSTs είναι η αποτοξίνωση των οργανισμών από διάφορες ξενοβιοτικές, τοξικές ενώσεις. Μια κατηγορία τέτοιων ενώσεων αποτελούν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, δηλαδή εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). Στα εντομοκτόνα, υπάρχουν τέσσερις βασικές κατηγορίες:

- i. τα οργανοχλωρικά (endosulfan, aldrin, κ.α)
- ii. τα πυρεθροϊκά (permethrin, κ.α)
- iii. τα οργανοφωσφορικά (malathion, κ.α)
- iv. τα καρβαμιδικά (pirimicarb, κ.α)

Όσον αφορά στα ζιζανιοκτόνα και τα μυκητοκτόνα, κατηγοριοποιούνται κυρίως βάσει των ενζύμων-στόχων τους (Κλώνης, 2007).

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή περιγράφονται αναλυτικά στα επόμενα κεφάλαια.

1.3.8 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs

Η δομή καθώς επίσης και οι καταλυτικές ιδιότητες των συγκεκριμένων ενζύμων τα καθιστά μόρια ικανά να χρησιμοποιηθούν σε μια ποικιλία βιοτεχνολογικών εφαρμογών σε διάφορους τομείς (Perperopoulou *et al.*, 2017).

Παρακάτω, περιγράφονται κάποιες από τις σημαντικότερες εφαρμογές τους.

1.3.8.1 GSTs και Γεωπονία

Μια βιοτεχνολογική εφαρμογή είναι η ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, τα οποία να αποτοξινώνονται πιο εύκολα από τις φυτικές GSTs. Πράγματι, η κατανόηση του μηχανισμού αποτοξίνωσης μπορεί να βοηθήσει να σχεδιαστούν νέες ενώσεις πιο σταθερές και φιλικές προς το περιβάλλον (Skopelitou *et al.*, 2016).

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

Οι φυτικές GSTs έχουν μελετηθεί εκτενώς γιατί έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην αντιμετώπιση τόσο των βιοτικών (παθογόνα, ιοί, κ.α) όσο και των αβιοτικών καταπονήσεων (βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία, ξηρασία, κ.α) (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017; Kissoudis *et al.*, 2015). Έτσι, μια ακόμα εφαρμογή είναι η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών σε αυτές τις συνθήκες (Labrou *et al.*, 2015; Chronopoulou & Labrou, 2009). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η δημιουργία διαγονιδιακού βαμβακιού που εκφράζει το ισοένζυμο GSTNt107 από καπνό και είναι ανθεκτικό σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών και υψηλής αλατότητας, σε ζιζανιοκτόνα, καθώς επίσης εμφανίζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Ginger *et al.*, 2005). Επιπλέον, διαγονιδιακά φυτά καπνού που εκφράζουν την GST I από αραβόσιτο εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο alachlor, σε σχέση με τα φυτά που δεν έφεραν το γονίδιο (Karavangeli *et al.*, 2005).

1.3.8.2 GSTs και Περιβάλλον

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

συνεργάτες του απέδειξαν ότι φαρμακευτικά απόβλητα παρακεταμόλης μπορούν να μετατραπούν από GSTs σε μη τοξικά παράγωγά τους (Huber *et al.*, 2009). Επιπλέον, η ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με ένζυμα που έχουν προκύψει μέσω ενζυμικής μηχανικής και μπορούν να μεταβολίζουν ξενοβιοτικές ενώσεις, εφαρμόζονται στη διαχείριση και αποκατάσταση των περιβαλλοντικών ρύπων (Chatzikonstantinou *et al.*, 2017; Gunning *et al.*, 2014). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών καπνού με GST από μύκητες, τα οποία είναι ικανά να αποτοξινώνουν το ανθρακένιο (Tzafestas *et al.*, 2017).

1.3.8.3 GSTs και Βιοαισθητήρες

Ο βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή, η οποία διαθέτει βιολογικό μηχανισμό αναγνώρισης και μεταδίδει συνήθως ηλεκτρικό σήμα (Mehrotra, 2016; Bahadir & Sezginurk, 2015; Sassolas *et al.*, 2012). Αποτελείται από δυο βασικά στοιχεία, ένα βιοϋποδοχέα και ένα μετατροπέα. Συγκεκριμένα, ο βιοϋποδοχέας είναι ένα ακινητοποιημένο βιολογικό στοιχείο, το οποίο αλληλεπιδρά με το μόριο-στόχο, ενώ ο μετατροπέας μεταβάλλει την βιοχημική αντίδραση σε ηλεκτρικό σήμα (Lucarelli *et al.*, 2008; Teles & Fonseca, 2008). Η έρευνα στον τομέα των βιοαισθητήρων είναι πολύ σημαντική, αφού οι αναλύσεις των δειγμάτων γίνονται γρηγορότερα, ευκολότερα και με πιο χαμηλό κόστος (Patel *et al.*, 2010; Kandimalla *et al.*, 2006). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να δώσουν στοιχεία μεγαλύτερης ακρίβειας από την κλασική χημεία με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Βρίσκουν εφαρμογή στον περιβαλλοντικό έλεγχο, στη βιομηχανία τροφίμων και στις κλινικές αναλύσεις (Jones *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2012). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η ελάχιστη προετοιμασία που χρειάζονται τα δείγματα πριν την ανάλυση. Πρώτοι οι Clark & Lyons, το 1962, ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης. Ύστερα από αυτήν την ανακάλυψη, ακολούθησε η κατασκευή πολλών βιοαισθητήρων βάσει διαφόρων ενζύμων, όπως οι οξυδοοξειδοκτάσες (Gokoglan *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014; Chatterjee & Majumdar, 2014), οι GSTs (Oliveira *et al.*, 2012; Kapoli *et al.*, 2008; Andreou & Clonis, 2002) κ.α.

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες είτε σύμφωνα με τον τύπο του βιοϋποδοχέα είτε σύμφωνα με το σήμα που μεταδίδουν (Goode *et al.*, 2014; Monosik *et al.*, 2012). Όσον αφορά στον βιοϋποδοχέα, οι τύποι του στοιχείου βιο-αναγνώρισης μπορεί να είναι το ζευγάρι αντιγόνου-αντισώματος, ενζύμου-υποστρώματος, νουκλεϊνικά οξέα-συμπληρωματικές αλληλουχίες ή ακόμα και ολόκληρα κύτταρα. Ωστόσο, ο συνηθέστερος

τύπος βιολογικών στοιχείων είναι τα ένζυμα, λόγω της εξειδίκευσης που εμφανίζουν με το μόριο-στόχο (Sima *et al.*, 2010; Serna *et al.*, 2009).

Στην κατασκευή του βιοαισθητήρα, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και ο μετατροπέας, αφού είναι υπεύθυνος να εντοπίζει και να ποσοτικοποιεί το μόριο-στόχο σε όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση (Dias *et al.*, 2014).

Ανάλογα με το σήμα που μεταδίδουν χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

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

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι ηλεκτροχημικοί και οι οπτικοί (Luong *et al.*, 2008; Cooper & Singleton, 2007). Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία και είναι πολύ εύκολοι στη χρήση τους (Conroy *et al.*, 2009). Από την άλλη μεριά, οι οπτικοί βιοαισθητήρες υπολογίζουν τις διαφορές στο φως και τις μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα (Garipcan *et al.*, 2011). Έτσι, η χρήση τους προσφέρει υπολογισμούς σε πραγματικό χρόνο και λεπτομερείς χημικές πληροφορίες σχετικά με το μόριο-στόχο (Patel *et al.*, 2010).

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

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

Σχετικά με τις ιατρικές εφαρμογές έχουν ήδη αναπτυχθεί βιοαισθητήρες σαν εργαλείο ανάλυσης ηπατο-νεοπλασματικών και προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων, με τη χρήση

ενός αντισώματος που αναγνωρίζει τη GST του πλακούντα και εκτιμά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της 2-μακρογλοβουλίνης (Sugata *et al.*, 2005). Επιπλέον, αρκετές GSTs έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η αλλεργική ρινίτιδα κ.α. (Alnaes *et al.*, 2015; Dessi *et al.*, 2012; Iorio *et al.*, 2014).

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

1.3.8.4 GSTs και Ιατρική

Οι GSTs, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προστατεύουν τα κύτταρα από ενδογενείς και εξωγενείς ξеноβιοτικές ουσίες, ωστόσο αυτός ο ρόλος κάποιες φορές δημιουργεί προβλήματα.

Στην ιατρική, οι GSTs εμπλέκονται σε τρεις διαφορετικούς τομείς:

A) στον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων ως μοριακοί στόχοι (Pouliou *et al.*, 2015; Perperopoulou *et al.*, 2014). Πράγματι, οι GSTs αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους τόσο για την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων όσο και για τον σχεδιασμό φαρμάκων και προφαρμάκων, λόγω της συμμετοχής τους σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης των κυττάρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ένζυμο GSTP1-1 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, άρα μπορεί να αποτελέσει μοριακό στόχο για την ενεργοποίηση των προφαρμάκων. Ένα τέτοιο προφάρμακο είναι το TLK286, το οποίο ενεργοποιείται από το αμινοξύ Tyr7 του ενεργού κέντρου της GSTP1-1 ανθρώπου. Επιπλέον, ένα ακόμα προφάρμακο είναι η αζαθειοπρίνη, η οποία λειτουργεί ανοσοκατασταλτικά. Συγκεκριμένα, η βιομετατροπή της στην ενεργή μορφή 6-μερκαπτοπουρίνη καταλύεται από GSTs που ανήκουν κυρίως στην τάξη alpha και ειδικότερα η GSTA2-2 (Eklund *et al.*, 2006).

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

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο σχεδιασμός νέων πεπτιδικών αναλόγων της γλουταθειόνης (GSH) με σκοπό την ανάπτυξη νέων αναστολέων των GSTs, ο οποίος τα τελευταία χρόνια

παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα (Mahajan & Atkins, 2005). Η ανάπτυξη μεθόδων συνθέσεως μη φυσικών αμινοξέων, ως συστατικών μοριακών σχηματισμών με θεραπευτική δράση σε συνδυασμό με την ανάπτυξη συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων παρουσιάζει έντονη αύξηση τα τελευταία χρόνια (Renfrew *et al.*, 2012; Meschenmoser *et al.*, 2013).

B) ως γενετικοί διαγνωστικοί δείκτες για διάφορες ασθένειες (Lu *et al.*, 2016). Έρευνες έχουν δείξει ότι σε πολλούς όγκους αυξάνεται η έκφραση του ισοενζύμου GSTP1-1 σε σχέση με την έκφρασή του στους φυσιολογικούς ιστούς (Kelley *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1989). Σύμφωνα με έρευνες, οι πολυμορφισμοί των GSTs του ανθρώπου σχετίζονται άμεσα με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία (Oldenburg *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2003; Stoehlmacher *et al.*, 2002). Έτσι, οι διάφορες μορφές των GSTs μπορούν στο μέλλον να αποτελέσουν παράγοντες για την ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας (Oldenburg *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2003;). Μελέτες στις οποίες λαμβάνεται υπ' όψιν το γενετικό προφίλ των ασθενών ερευνούν την συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών των GSTs και συγκεκριμένων ασθενειών, όπως η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Covolo *et al.*, 2008), νευρολογικών προβλημάτων (Kumar *et al.*, 2017), σχιζοφρένειας (Kim *et al.*, 2015), αλλεργιών (Bowatte *et al.*, 2016) κ.α. Στον άνθρωπο, οι περισσότεροι πολυμορφισμοί είναι αποτέλεσμα της αλλαγής ενός νουκλεοτιδίου (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) και σπανιότερα μεταλλάξεων εξαλείψεως (Hui-Wen & Ali-Osman, 2007). Έτσι, η επιστήμη της φαρμακογονιδιοματικής βασίζεται στους SNPs (Sun *et al.*, 2010), οι οποίοι μπορούν να μεταβάλλουν την έκφρασή τους ή τη δραστηρότητα τους επηρεάζοντας τη διάθεσή τους στον οργανισμό και τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας (Bernig & Chanock, 2006). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο αλληλόμορφος GSTP1*C, ο οποίος λειτουργεί πιο προστατευτικά για τα κύτταρα ως προς τα φάρμακα cisplatin και carboplatin σε σχέση με τους αλληλομόρφους GSTP1*A και GSTP1*B (Ishimoto & Ali-Osman, 2002). Επιπλέον, οι αλληλόμορφοι GSTP1*B και GSTP1*C σε ασθενείς που έπασχαν από οξεία και χρόνια μυελώδη λευχαιμία, γλοιώμα, πολλαπλό μυέλωμα, λέμφωμα Hodgkin και καρκίνο της ουροδόχου κύστεως προσδίδουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και μεγαλύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με άλλους αλληλομόρφους (Maggini *et al.*, 2008; Goekkurt *et al.*, 2006; Allan *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 1999). Σε περιπτώσεις παιδικής οξείας λευχαιμίας και καρκίνου των ωοθηκών, ο αλληλόμορφος GSTM1*0 παρουσίασε καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία σε σχέση με τους αλληλομόρφους GSTM1*A και GSTM1*B (Howells *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 1994). Σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες, οι

λειτουργικοί γονιδιωματικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων-στόχων φαρμάκων, των ενζύμων μεταβολισμού και των ενζύμων επιδιόρθωσης DNA είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου (Park et al., 2001; Lima et al., 1999).

Γ) ως μεταφορείς φαρμάκων σε συγκεκριμένο στόχο (Namiki et al., 2003). Οι GSTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία μεταφοράς για διαμεμβρανικές μεταφορές. Πράγματι, το ισοένζυμο GST26 από *Schistosoma japonica* έχει την ικανότητα να διαπερνά και να μεταφέρεται στα κύτταρα θηλαστικών (Namiki et al., 2003). Ο Morris και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι και άλλες GSTs από ανθρώπινο οργανισμό είναι ικανές να διεισδύουν σε μεμβράνες (Morris et al., 2009).

1.3.8.5 GSTs και Νανοβιοτεχνολογία

Ένας ακόμα κλάδος στον οποίο κερδίζουν έδαφος οι GSTs είναι αυτός της νανοβιοτεχνολογίας. Συγκεκριμένα, οι GSTs μπορούν να βοηθήσουν στην κατασκευή νανοβιοαισθητήρων και νανοδομών, όπως είναι οι νανοσωλήνες και οι νανοδακτύλιοι. Αυτά τα νέα νανοϋλικά εμφανίζουν αξιοσημείωτες ιδιότητες, χάρη στο μικρό τους μέγεθος και στην ευκολία της χρήσης τους (Saxena & Das, 2016; Hou et al., 2016; Sagadevan & Periasamy, 2014). Ένα άλλο πλεονέκτημα τους αφορά την ακινητοποίηση σε αυτά διάφορων ενζύμων, η οποία είναι εύκολη, χαμηλή σε κόστος και επαναχρησιμοποιούμενη (Ansari & Husain, 2012). Υπάρχουν διάφορα παραδείγματα νανοβιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν GSTs, όπως ο νανοβιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε για να ανιχνεύει το παθογόνο *Polymyxa betae* (Safarpour et al., 2012). Επίσης, ο SaatÇi και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν δυο διαφορετικούς τύπους GSTs προκειμένου να κατασκευάσουν έναν νανοβιοαισθητήρα, ο οποίος να ανιχνεύει βαρέα μέταλλα, ειδικότερα κάδμιο και ψευδάργυρο (SaatÇi et al., 2007). Τέλος, οι GSTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή νανοϋλικών με συγκεκριμένο προσανατολισμό (Bai et al., 2013).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα διατριβή, σκοπός ήταν ο συνδυασμός βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας στο πεδίο της βιοτεχνολογίας με αντικείμενο τη μελέτη των GSTs από διαφορετικές τάξεις και οργανισμούς. Η μελέτη χωρίστηκε σε τρεις βασικούς άξονες. Πρώτον, σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν αρχέγονες μορφές του ενζύμου. Δεύτερον, μελετήθηκαν φυτικές GSTs και τρίτον, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε ένζυμα από ζωικό οργανισμό δυο διαφορετικών τάξεων. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη μορφή του ενζύμου, προκειμένου να

κατασκευαστεί ένας ενζυμικός βιοαισθητήρας, ικανός να ανιχνεύει φυτοφάρμακα σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Βασικός σκοπός του πρώτου άξονα της εργασίας ήταν να μελετηθούν αρχέγονες μορφές GSTs, ώστε να ελεγχθούν εμπειρικά οι υποθέσεις σχετικά με την λειτουργία των γονιδίων από το εξελικτικό παρελθόν. Τα αρχέγονα γονίδια που μελετήθηκαν ανήκαν σε διάφορες τάξεις των GSTs και τα αποτελέσματα της μελέτης συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες σύγχρονες μορφές των ενζύμων.

Στον δεύτερο άξονα της διατριβής, μελετήθηκαν φυτικές GSTs ως προς τα δομικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά τους, προκειμένου να βρεθούν μορφές του ενζύμου με ευνοϊκές ιδιότητες. Ειδικότερα, σκοπός ήταν να βρεθεί μια φυτική GST που να συνδυάζει υψηλή ενζυμική δραστηριότητα, αυξημένη θερμοσταθερότητα και εξειδικευμένη εκλεκτικότητα σε κάποια φυτοπροστατευτική ένωση.

Ο τρίτος άξονας της εργασίας αφορούσε τη μελέτη GSTs από έναν οργανισμό, ο οποίος διαβιεί σε εξαιρετικά αντίξοες συνθήκες, την καμήλα. Σκοπός ήταν η μελέτη των καταλυτικών και δομικών χαρακτηριστικών δυο ενζύμων από διαφορετικές τάξεις, προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός αποτοξίνωσης του συγκεκριμένου οργανισμού. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μελέτη βοήθησε στην κατανόηση της προσαρμογής του συγκεκριμένου οργανισμού σε συνθήκες ερήμου.

Συνολικός σκοπός των προαναφερθέντων μελετών, ήταν η δημιουργία ενός βιοαισθητήρα ικανού να ανιχνεύει μια συγκεκριμένη φυτοπροστατευτική ένωση σε δείγματα νερού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

2.1.1 Βιολογικά υλικά

Στο πλαίσιο των πειραμάτων του συγκεκριμένου διδακτορικού, προκειμένου να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση και στη συνέχεια έκφραση των γονιδίων GST χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pETite (C-His vector) με δεκτικά κύτταρα HI-control™ 10G (SOLOs) και εκφραστικά κύτταρα HI-control BL21(DE3) (SOLOs) της εταιρείας Lucigen (ΗΠΑ), καθώς επίσης και ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5-CT/TOPO® της εταιρείας Invitrogen (ΗΠΑ) με δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) της εταιρείας Novagen (ΗΠΑ).

2.1.2 Ένζυμα και πρωτεΐνες

Για την πέψη των νουκλεϊνικών οξέων, χρησιμοποιήθηκε η νουκλεάση DNaseI (2 U/μL) από την εταιρεία Invitrogen (ΗΠΑ). Οι πολυμεράσες Taq DNA πολυμεράση (5 U/μL) και Platinum™ Pfx DNA πολυμεράση (2,5 U/μL) προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen (ΗΠΑ). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η Accura® High-Fidelity πολυμεράση (2 U/μL) της εταιρείας Lucigen (ΗΠΑ) και KAPA Taq και KAPA HiFi (1 U/μL) πολυμεράσες από τον οίκο KAPA Biosystems (ΗΠΑ).

2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια και υποστρώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια:

Πίνακας 2.1: Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων.

| Χημικό αντιδραστήριο | Εταιρεία |
|-------------------------------------|-----------------|
| Αλβουμίνη μόσχου (BSA) (fraction V) | Sigma-Aldrich |
| Αμπικιλίνη 99,9 % | Sigma-Aldrich |
| Καναμυκίνη | Sigma-Aldrich |
| Μαλεϊμίδιο | Sigma-Aldrich |
| Πεπτόνη | Scharlau |
| Άγαρ | Scharlau |
| Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract) | Scharlau |
| Δωδεκανοθειικό Νάτριο (SDS) | Sigma-Aldrich |
| Αγαρόζη | Invitrogen |

| | |
|--|--|
| Ισοπρότυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) | AppliChem |
| N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED) | Sigma-Aldrich |
| Οξικό Νάτριο (CH ₃ COONa) | Merck |
| Όξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH ₂ PO ₄) | Merck |
| Υπερθειικό Αμμώνιο (Ammonium Pelsulfate- APS) | Sigma-Aldrich |
| Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) | Merck |
| Coomassie Brilliant Blue (R-250) | Merck |
| Χρωματογραφικό υλικό Sepharose CL-6B | Sigma-Aldrich |
| Δείκτης μοριακών μαζών DNA (DNA ladder) | Nippon Genetics |
| Δείκτης μοριακών μαζών πρωτεϊνών (Protein Marker) | Nippon Genetics |
| Εκκινητές αντίδρασης πολυμεράσης | Invitrogen |
| Kit απομόνωσης πλασμιδίου | Thermo-Scientific και Macherey-Nagel |
| Kit χρωστικής για διαφορική σάρωση φθορισμού (DSF) (Protein Thermal Shift Dye) | Applied Biosystems |

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υποστρώματα:

Πίνακας 2.2: Κατάλογος υποστρωμάτων.

| Υπόστρωμα | Εταιρεία |
|--|-----------------|
| 1-γλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) | Sigma-Aldrich |
| Γλουταθειόνη (ανηγμένη) (GSH, Reduced form) | Sigma-Aldrich |
| 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) | Sigma-Aldrich |
| 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) | Sigma-Aldrich |
| 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB) | Sigma-Aldrich |

| | |
|---|---------------|
| Υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου (CuOOH) | Fluka |
| Τετρα-βούτυλο υδροϋπεροξειδίο (Tetr-butyl hydroperoxide) | Sigma-Aldrich |
| Βενζοϊκό υπεροξειδίο (Benzoy peroxide) | Sigma-Aldrich |
| 2,2-διθειοαιθανόλη | Fluka |
| Σουλφανιλαμίδη | Sigma-Aldrich |
| 4-χλώρο-7-νιτροβενζοφουραζάνιο | Sigma-Aldrich |
| Παρα-νιτροβενζολικό χλωρίδιο | Sigma-Aldrich |
| Διϋδρο-ασκορβικό οξύ | Biochemica |
| Εθακρυνικό οξύ | Sigma-Aldrich |
| Τρανς-4-φαίνυλ-3-βουτεν-2-όνη | Sigma-Aldrich |
| Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη | Fluka |
| Τρανς-2-ενενάλη | Sigma-Aldrich |
| Ισοθειοκυανικός αλλύλ-εστέρας | Sigma-Aldrich |
| Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθύλ-εστέρας | Sigma-Aldrich |

Για τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω φυτοπροστατευτικές ενώσεις:

| Φυτοπροστατευτικές ενώσεις | Εταιρεία |
|-----------------------------------|-----------------|
| Permethrin | Riedel de Haen |
| Carbaryl | |
| Atrazine | |
| Diuron | |
| Fluorodifen | |
| Alachlor | |
| Metolachlor | |

Οι υπόλοιπες φυτοπροστατευτικές ενώσεις ήταν ευγενική προσφορά του αναπληρωτή καθηγητή Βόντα Ιωάννη του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.1.4 Πλαστικά αναλώσιμα

Τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

Πίνακας 2.3: Κατάλογος πλαστικών αναλωσίμων που χρησιμοποιήθηκαν.

| | |
|---|------------------|
| Πλαστικά ακρορύγχια (tips) | Kisker Biotech |
| Πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 ml (Falcon) | SPL Life science |
| Πλαστικά φιαλίδια των 1,5 και 2 ml (eppendorf) | Greiner Bio-one |
| Πλαστικές κυβέτες μιας χρήσης semi-macro | Biosigma s.r.l. |
| Ημιπερατές Μεμβράνες διαπίδυσης | Spectrum |

2.1.5 Όργανα

- Οι προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Lamda-Bio μονής δέσμης, ορατού υπεριώδους, του οίκου Perkin-Elmer.
- Οι προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο HITACHI διπλής δέσμης, ορατού υπεριώδους, με θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας του οίκου Perkin-Elmer. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο HITACHI διπλής δέσμης, ορατού υπεριώδους, μοντέλο U-2900 χωρίς θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.
- Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πεχαμέτρου ORION (μοντέλο 410 A).
- Οι ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή MINI-SUB[®] CELL GT της εταιρείας BioRad, ενώ οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν σε MINI PROTEAN[®] TETRAN SYSTEM της ίδιας εταιρείας, συνδεδεμένες με τροφοδοτικό SP500 x T (500 V, 400 mA) του οίκου Hoefler (HΠΑ).
- Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τον θερμικό κυκλοποιητή Gene Amp[®] 9700 της εταιρείας PE Applied Biosystems.

- Η διαφορική σάρωση θερμοδομετρίας (Differential Scanning Fluorimetry) πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα πραγματικού χρόνου (Real Time) StepOne System της εταιρείας PE Applied Biosystems.
- Η ζύγιση των χημικών αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φαρμακευτικού ζυγού METTLER PM 2500 και του αναλυτικού ζυγού METTLER AT261.
- Η εξισορρόπηση των δειγμάτων, που προορίζονται για φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας (enzyme assay) πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο Stuart.
- Η φυγοκέντρωση των μικροβιακών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φυγοκέντρου EPPENDORF.
- Η διάρρηξη των κυττάρων έγινε με συσκευή δονήσεων υπερήχων Vibra Cell της εταιρείας Sonics & Materials.
- Επωαστήρας με λειτουργία ταυτόχρονης ανάδευσης των κυτταρικών καλλιεργειών της εταιρείας Lab Tech.
- Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο (Αφοί Αγγελόπουλοι).
- Μηχανικές πιπέτες (Lambate pro).

2.1.6 Προγράμματα Η/Υ

- UVKinLab (Perkin-Elmer Software)
- GraFit 3.0 (Erithacus Software, Ltd, UK)
- Protein Thermal Shift™ Analysis Software
- GraphPad Prism 7
- PyMol
- ChemDraw
- UCSF Chimera

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Προετοιμασία δεκτικών και εκφραστικών βακτηριακών κυττάρων DH5α, 10G Hi-Control και BL21(DE3)

Μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους λαμβάνεται από αποστειρωμένο τρυβλίο, που περιέχει το απαραίτητο αντιβιοτικό στην κατάλληλη συγκέντρωση. Η μονή αποικία αναπτύσσεται σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) χωρίς αντιβιοτικό για 16 h στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση στις 180 rpm. Στη συνέχεια, αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB 200 mL χωρίς αντιβιοτικό, μολύνεται με 2 mL από την αρχική καλλιέργεια και επωάζεται στους 37°C, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα (OD) στα 550 nm να είναι περίπου 0,5. Έπειτα, η καλλιέργεια τοποθετείται 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 σε παγωμένο διάλυμα 25 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH 8 όγκου ίσου με το 1/2 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 100 mL) και ψύχεται για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 4.500 rpm στους 4°C και επαναιώρηση των κυττάρων σε παγωμένο διάλυμα 75 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH 8 όγκου 1/15 της αρχικής καλλιέργειας (δηλ. 13,3 mL). Κατόπιν το αιώρημα τοποθετείται στον πάγο και προστίθεται γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 15 % (v/v). Αναδεύονται ήπια και διατηρούνται στον πάγο για 10 min. Τέλος, μοιράζονται σε κλάσματα των 200 µL σε παγωμένα αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου erpendorf και φυλάσσονται στους - 80°C.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Θρεπτικό μέσο LB:

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

Για την παρασκευή τρυβλίων, προστίθεται 1,5 % (w/v) άγαρ.

Διαλύματα προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων:

- ❖ 25 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH 8,
- ❖ 75 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris pH 8

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Η διαδικασία που περιγράφεται αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Birnboim & Doly (1979), όπου μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό LB (Luria-Bertani), με πιθανή παρουσία αντιβιοτικού (ως μέσο επιλογής) στους 37°C για 16 h υπό συνεχή ανάδευση στις 180 rpm. Ακολούθως 1 mL από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 µL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (Lysis Buffer). Στη συνέχεια, 400 µL από διάλυμα NaOH/SDS προστίθενται, το εναιώρημα αναμιγνύεται προσεχτικά και επωάζεται σε πάγο για 5 min ακριβώς. Μετά το πέρας των 4 min, παρασκευάζεται διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A, το οποίο προστίθεται στο εναιώρημα. Ακολουθεί ήπια ανάδευση, επώαση στον πάγο για 10 min και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου eppendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπανόλη 700 µL και μετά από ανάδευση το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1 mL 70 % (v/v) παγωμένης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (DNA) επαναδιαλύεται σε 30-50 µL αποστειρωμένου ddH₂O, αφού έχει εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται για 3 min στις 13.000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου eppendorf.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer):

- ❖ 0,5 M Tris-Cl pH 8 150 µL
- ❖ 0,5 M EDTA pH 8 60 µL
- ❖ 2 M γλυκόζη 75 µL

Οι παραπάνω ποσότητες αφορούν την παρασκευή 3 mL διαλύματος.

Διάλυμα NaOH-SDS:

- ❖ 10 M NaOH 114 μ L
- ❖ 10 % (w/v) SDS 568 μ L

Οι παραπάνω ποσότητες αφορούν την παρασκευή 5 mL διαλύματος.

Διάλυμα CH₃COONH₄-RNάσης A:

- ❖ 7,5 M CH₃COONH₄ pH 7,8 4,5 mL
- ❖ Διάλυμα RNάσης A 45 μ L

Οι παραπάνω ποσότητες αφορούν την παρασκευή 4,5 mL διαλύματος.

Διάλυμα RNάσης A:

- ❖ Σε 10mM Tris-Cl pH 7,4 και 15 mM NaCl, διαλύεται η RNάση σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 15 min και αφού η θερμοκρασία του φτάσει στους 25°C, αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Σε πορώδες πήκτωμα αγαρόζης κινούνται τα τμήματα DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, προκειμένου να διαχωριστούν και να αναλυθούν ανάλογα με το μέγεθος τους. Η συγκέντρωση του πηκτώματος της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεκριμένα πειράματα ήταν 1 % (w/v).

Αρχικά, προετοιμάζεται η πηκτής ηλεκτροφόρησης 1 % (w/v). Συγκεκριμένα, το διάλυμα πηκτής θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Έπειτα, αφού μειωθεί λίγο η θερμοκρασία του, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,5 μ g/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται, γιατί αλληλεπιδρά με τις βάσεις των μορίων και φθορίζει σε υπεριώδες φως. Το διάλυμα εισάγεται στο ειδικό δοχείο, όπου τοποθετείται το χτενάκι με τις ειδικές εσοχές (πηγαδάκια), στα οποία τοποθετούνται τα υπο μελέτη δείγματα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου στερεοποιηθεί, περίπου 20-30 min.

Έπειτα, το δοχείο με τη πηκτή μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια φορτώνονται ο μάρτυρας και τα δείγματα. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, αναμειγνύονται καλά 10 μ L από το επιθυμητό DNA και 6 μ L από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και υποβάλλονται σε σύντομο στροβίλισμα (spin). Ως μοριακός δείκτης, χρησιμοποιείται 1 kb DNA ladder (μάρτυρας). Σε ένα από τα πηγαδάκια προστίθεται χρωστική, συνήθως κυανό

της βρωμοφαινόλης, για την καλύτερη παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Με εφαρμογή συνεχούς τάσης από 75 έως 99 V περίπου, τα μόρια κινούνται προς τον θετικό πόλο του ηλεκτροδίου. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρεται σε ειδική συσκευή παρατήρησης και με υπεριώδες φως γίνεται η ανίχνευση των ζωνών που εμφανίζονται.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα πηκτής:

- ❖ 0,5 g αγαρόζης
- ❖ 1 mL διαλύματος 50X TAE
- ❖ 49 mL δις απιονισμένο νερό

Οι παραπάνω ποσότητες αφορούν τελικό όγκο πηκτής 50 mL.

Διάλυμα 50X TAE:

- ❖ 2 M Tris
 - ❖ 1 M CH₃COOH
 - ❖ 0,05 M EDTA
- } pH 8,2-8,4

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

- ❖ 6 mL διαλύματος 50X TAE
- ❖ 294 mL δις απιονισμένο νερό

Οι παραπάνω ποσότητες αφορούν τελικό όγκο διαλύματος 300 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer):

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

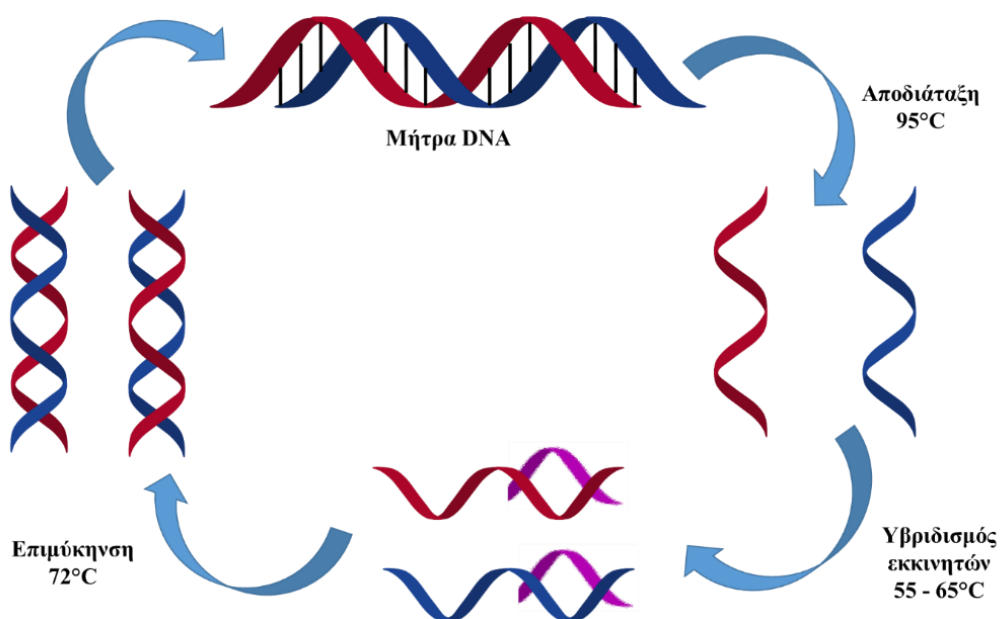
2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ανάλογα με τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες των άκρων του υπο μελέτη DNA, συντίθενται ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (primers), συμπληρωματικοί των παραπάνω άκρων. Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται οδηγεί στη σύνθεση νέων κλώνων DNA ταυτόσημων με την περιοχή μεταξύ των άκρων όπου δεσμεύονται οι εκκινητές. Τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε φιαλίδιο τύπου eppendorf χωρητικότητας 0,2 mL κατάλληλο για PCR και αναμιγνύονται καλά. Στο τέλος, προστίθεται η πολυμεράση

και τα φιαλίδια τύπου erpendorf τοποθετούνται στο μηχάνημα. Οι ποσότητες των συστατικών ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που συνήθως χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι το ακόλουθο:

- ✓ ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ: 95°C για 3-5 min
- ✓ ΚΥΚΛΟΣ (25-30 κύκλοι):
 - Αποδιάταξη: 95°C για 15-30 s
 - Υβριδισμός εκκινητών: 55-65°C (ανάλογα τους εκκινητές) για 30 s
 - Επιμήκυνση: 72°C για 80 s
- ✓ ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ: 72°C για 10 min



Εικόνα 2.1: Στάδια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές παρουσιάζονται με μωβ χρώμα.

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

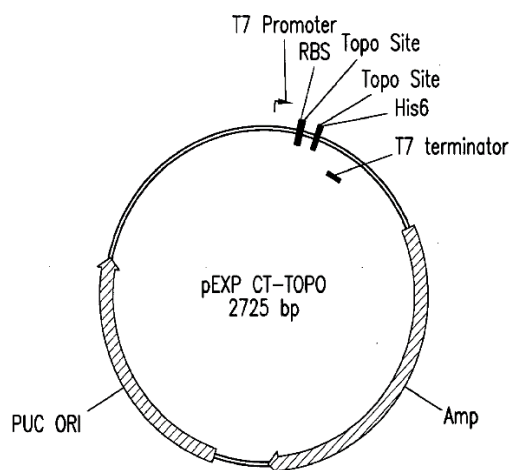
2.2.5 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA και μετάφραση

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MWG-Biotech AG (Γερμανία). 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/>).

2.2.6 Υποκλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®

Η ένωση (ligation) των προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® πραγματοποιείται με την τεχνολογία του TOPO® Cloning, όπως περιγράφεται στο βιβλίο οδηγιών pEXP5-CT/TOPO®TA Kit (Invitrogen, USA).



Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pEXP CT-TOPO.

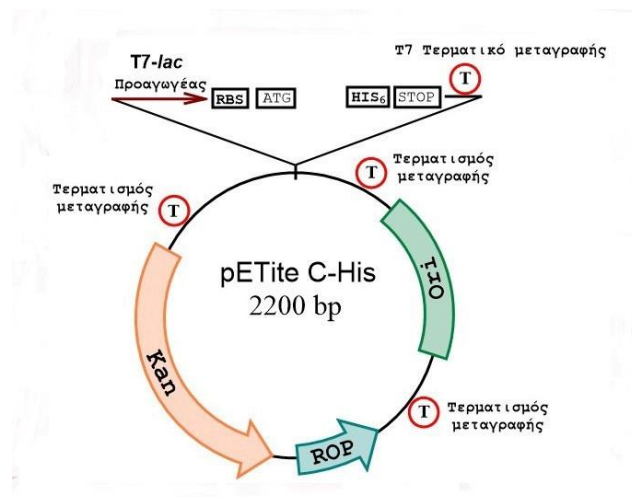
Τα στάδια κατά την αντίδραση ένωσης των προϊόντων PCR στο φορέα pEXP5-CT/TOPO® φαίνονται παρακάτω:

- Προσθήκη καταλοίπων αδενίνης (A) στο 3'-άκρο του PCR προϊόντος, ώστε να γίνει η πρόσδεση του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα. Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται 50 μL PCR προϊόντος με 2 U Ταq πολυμεράσης και το μίγμα επωάζεται στους 72°C για 10 min.
- Αντίδραση κλωνοποίησης του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα (TOPO Cloning Reaction) όπου αναμιγνύονται:
 - 1-4 μL προϊόντος
 - 1 μL φορέα pEXP5-CT/TOPO®
 - 1 μL διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)
 - Δις-απιονισμένο αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 6 μL .

- Το μίγμα αναδεύεται ήπια, επώάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και τοποθετείται τον πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 2.14.

2.2.7 Υποκλωνοποίηση γονιδίων με τη χρήση της τεχνολογίας EXPRESSO™

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο σύστημα καλείται pETite™ και παρέχεται από την εταιρεία Lucigen σε επεξεργασμένη μορφή και ευθυγραμμισμένος. Ο συγκεκριμένος φορέας αποτελεί μετεξέλιξη του συνηθισμένου εκφραστικού φορέα pET. Το μικρό του μέγεθος (2,2 kb) επιτρέπει την εισαγωγή μεγαλύτερων τμημάτων DNA. Επίσης, διαθέτει τον ισχυρό προαγωγέα T7 του οπερονίου της λακτόζης για υψηλά επίπεδα ετερόλογης έκφρασης, ωστόσο ο αριθμός των αντιγράφων του στο κύτταρο είναι χαμηλός.



Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pETite™.

Η υποκλωνοποίηση ενός γονιδίου στον συγκεκριμένο φορέα πραγματοποιείται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, καθώς το γονίδιο που πρόκειται να εισαχθεί διαθέτει στα άκρα του τμήμα από το πλασμίδιο. Συνεπώς, το επιθυμητό γονίδιο πρέπει να έχει τα κατάλληλα τμήματα του πλασμιδίου στην αρχή και στο τέλος του, προς διευκόλυνση του ομόλογου ανασυνδυασμού.

Για αυτό το λόγο, οι εκκινητές που σχεδιάζουμε στην συγκεκριμένη περίπτωση έχουν την εξής μορφή:

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

Όπου, XXX2-XXX8 είναι τα αρχικά κωδικόνια του επιθυμητού γονιδίου.

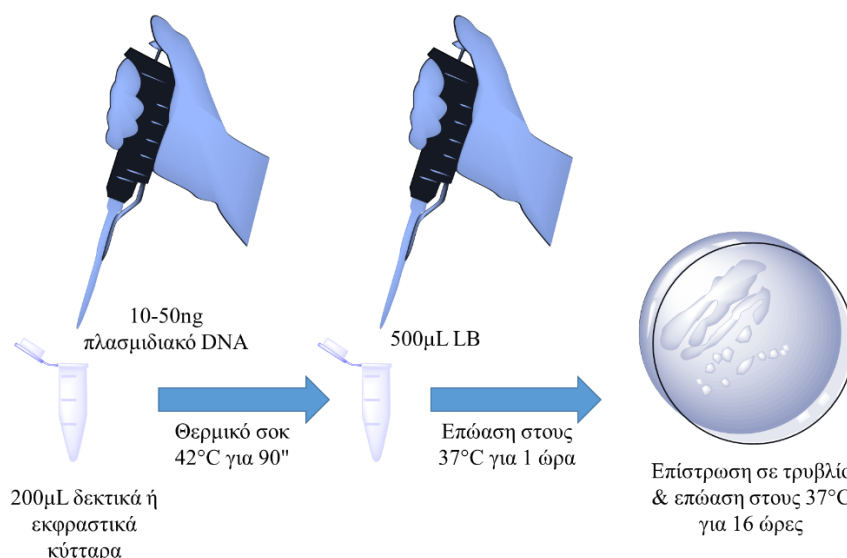
ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ: 5'-GTG-ATG-GTG-GTG-ATG-ATG-XXXv-XXXv-1-XXXv-2-XXXv-3-XXXv-4-XXXv-5-XXXv-6-3'

Όπου, XXXv-XXXv-6 είναι τα αντίστροφα και συμπληρωματικά τελευταία κωδικόνια του γονιδίου ενδιαφέροντος.

Η PCR πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 2.10 και ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 2.14.

2.2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών και εκφραστικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Σε περίπου 200 μ L δεκτικών κυττάρων προστίθενται περίπου 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Αναμιγνύονται με ήπια ανάδευση και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat shock) των κυττάρων με επώαση στους 42°C για 90 s και έπειτα μεταφέρονται αμέσως στον πάγο και αφήνονται για περίπου 2 min, ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους. Προστίθενται 500 μ L θρεπτικού μέσου LB, το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στους 37°C για 1 h. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντριση στις 2000 rpm για 1 min και αφού αφαιρεθεί το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου, επαναδιαλύονται τα κύτταρα με ήπιο τρόπο (100 μ L). Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με κατάλληλο αντιβιοτικό και το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 16 h.



Εικόνα 2.4: Διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών ή εκφραστικών κυττάρων.

2.2.9 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου GST σε στελέχη κυττάρων *E. coli*

Τα ισοένζυμα GST της συγκεκριμένης διατριβής εκφράστηκαν σε στελέχη κυττάρων *E. coli* με θρεπτικό μέσο LB ή θρεπτικό μέσο με λακτόζη ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων και αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη).

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

Τα στάδια αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής :

1. Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών ανασυνδυασμένων κυττάρων *E. coli* BL21 που περιέχουν το πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/mL) ή καναμυκίνη (30 mg/mL).
2. Επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου με προσθήκη 1 mM ισοπρόπυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG), τη χρονική στιγμή που η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών, στα 600 nm, είναι ίση με 0,6 και επώαση υπό ταυτόχρονη ανάδευση για 4 h.
3. Συλλογή της πάστας των κυττάρων, έπειτα από φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές για 10 min και φύλαξη της στους -20°C για μελλοντική χρήση.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Θρεπτικό μέσο με λακτόζη:

- ❖ 1 % (w/v) πεπτόνη
- ❖ 0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης
- ❖ 0,5 % (w/v) γλυκερόλη
- ❖ 0,05 % (w/v) γλυκόζη
- ❖ 0,2 % (w/v) λακτόζη
- ❖ 0,07 % (w/v) Na₂S₂O₈
- ❖ 0,25 % NH₄Cl
- ❖ 0,01 % (w/v) KCl, MgCl₂, CaCl₂

2.2.10 Λύση κυττάρων και παραλαβή ενζυμικού εκχυλίσματος

Επιθυμητή ποσότητα πάστας των κυττάρων, που έχει συλλεχθεί και φυλαχθεί στους -20°C, μεταφέρεται σε φιαλίδια τύπου erpedorf και ζυγίζεται η μάζα της. Έπειτα, η πάστα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (20

mM, pH 7) και τα κύτταρα διαρρηγνύονται με την εφαρμογή υπερήχων (10 φορές × 5 s) σε πάγο, προκειμένου να αποφευχθεί η μετουσίωση της πρωτεΐνης από την παραγόμενη θερμότητα. Τέλος, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 5 min και συλλέγεται το υπερκείμενο του διαλύματος.

2.2.11 Διαπίδυση

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

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

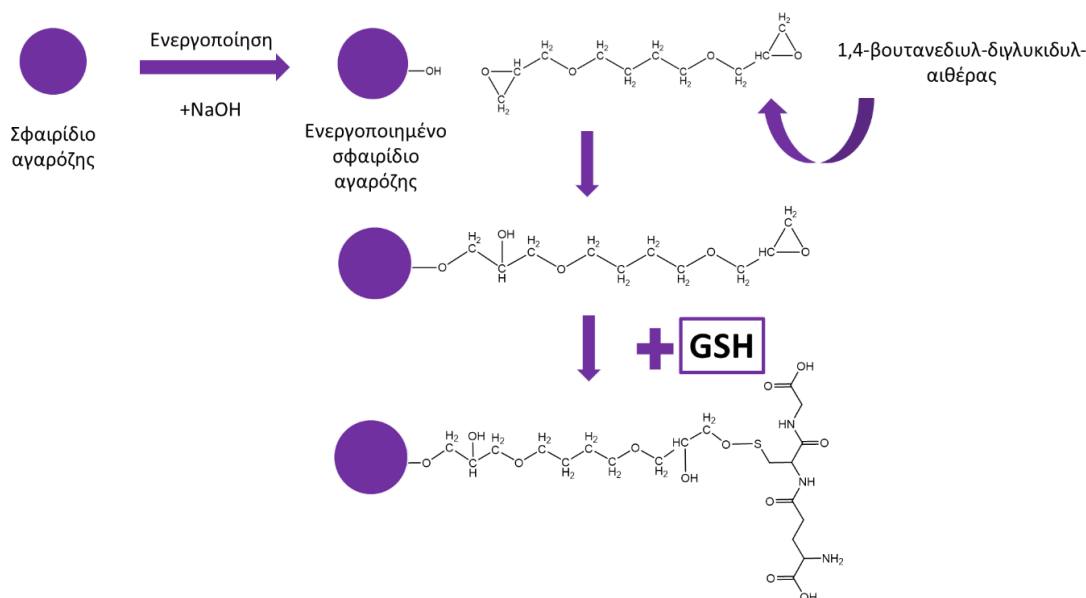
Σε διαπίδυση υποβάλλεται το ενζυμικό εκχύλισμα που παραλάβαμε μετά τη λύση των κυττάρων αφού τοποθετηθεί στη μεμβράνη, η οποία ασφαρίζεται πολύ καλά για να αποφευχθεί η απώλεια του δείγματος. Το δείγμα με τη μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ίδιας σύστασης με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

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

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

Στην ενεργοποιημένη πλέον αγαρόζη, προστίθενται 3 mL 1,4-βουτανεδιυλ-διγλυκιδυλ-αιθέρας. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 h υπό συνεχή κυκλική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Το διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινο μπουκαλάκι, για να αποφευχθεί η υδρόλυση του αιθέρα. Ακολούθως, το αιώρημα διηθείται και πλένεται με δις απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα GSH (300 μmol, 0

προσροφητής έχει υποκατάσταση 20 μmol GSH/g αγαρόζης), το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 M Na_2HPO_4 pH 8 (40 mL). Η αντίδραση αφήνεται για 48 h υπό συνεχή κυκλική 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 2.5: Δημιουργία του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιωλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-sepharose-CL6B (BES-GSH) με εποξειδική ενεργοποίηση της στερεάς φάσης.

2.2.13 Καθαρισμός των ισοενζύμων GST σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας

Ο καθαρισμός των ενζύμων ακολούθησε τα παρακάτω στάδια:

1. Πλύσιμο με 10 mL δις απιονισμένου νερού (ddH_2O) και εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης συγγένειας (10 mL) με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL, 20 mM, pH 7) στους 4°C .
2. Φόρτωση του ενζυμικού εκχυλίσματος στη χρωματογραφική στήλη συγγένειας προσροφητή 1,4-βουτανεδιωλ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH).

Από το στάδιο αυτό μέχρι το τελικό στάδιο του καθαρισμού, όλα τα κλάσματα που εκρέουν από τη στήλη συλλέγονται και φυλάσσονται το καθένα ξεχωριστά σε περίπτωση που χρειαστεί περαιτέρω μελέτη.

3. Έκπλυση της στήλης με 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20mM, pH 7) (wash buffer).
4. Έκλουση του ενζύμου με διάλυμα 10 mM GSH (διαλυμένη σε 20 mM KH_2PO_4 pH 7), σε 10 κλάσματα του 1 mL έκαστο.

5. Αναγέννηση της στήλης με διαλύματα 0,1 M Tris-HCl και 1 M NaCl pH 8,5 (10 mL) και 0,1 M CH₃COONa και 1 M NaCl pH 5,5 (10 mL) και πλύσιμο με 10 mL ddH₂O. Πριν την εκροή της τελευταίας ποσότητας νερού που έχει προστεθεί, ασφαρίζεται με ειδικό πώμα η είσοδος και η έξοδος της κολώνας για την αποφυγή της ξήρανσης του φορέα καθαρισμού.

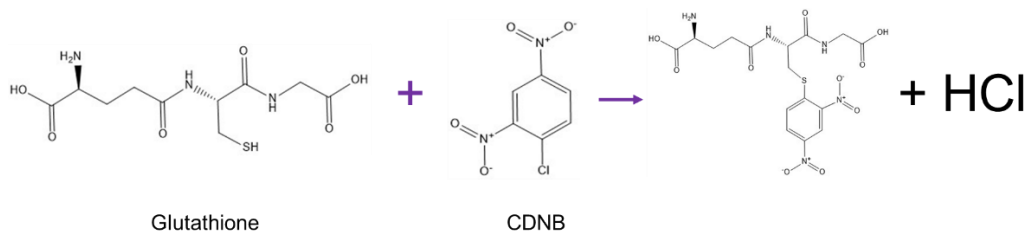
Τα ενζυμικά κλάσματα συλλέγονται και υπόκεινται σε φασματοσκοπικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (Παράγραφος 2.2.14) καθώς και σε προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Παράγραφος 2.2.16). Τα κλάσματα με δραστηριότητα ενώνονται και το παρασκεύασμα αραιώνεται με ίσο όγκο γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 % v/v) και ακολούθως το διατηρούμε στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 2.6: Στάδια καθαρισμού χρωματογραφίας συγγένειας.

2.2.14 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου GST

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας για το ένζυμο GST βασίζεται στον σχηματισμό ομοιοπολικού συμπλόκου του υποστρώματος CDNB και της GSH. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, οφειλόμενη στο σχηματισμό του συμπλόκου GS-CDNB.



Εικόνα 2.7: Αντίδραση που καταλύουν οι GSTs.

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

- i. **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- ii. **GSH:** 75 mM σε H₂O
- iii. **CDNB:** 30 mM σε αιθανόλη
- iv. **Ένζυμο:** αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος).

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

Αναλυτικά οι όγκοι σε ένα τυπικό προσδιορισμό είναι:

Πίνακας 2.4: Όγκοι σε έναν τυπικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου GST.

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

2.2.15 Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας GST

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

μέτρηση της οπτικής απορρόφησης καταγράφεται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης (ΔA) σε στοιχειώδη χρόνο (Δt). Αρχικά, λαμβάνεται ευθεία η οποία όμως, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης καμπυλώνει. Η κλίση της εφαπτομένης σε κάθε σημείο της καμπύλης ορίζεται ως η ταχύτητα της αντίδρασης.

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

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

όπου :

- $\Delta A / \Delta t$ καθαρή μεταβολή απορρόφησης στα 340 nm (1/min)
- $V_{\text{συνολ}}$ συνολικός όγκος αντίδρασης (όγκος κυψελίδας, mL)
- $V_{\text{ενζύμου}}$ όγκος του δείγματος ενζύμου στην αντίδραση (mL)
- d μήκος οπτικής διαδρομής φωτός μέσα από το δείγμα (1 cm)
- ϵ συντελεστής απόσβεσης (για το CDNB = 9600 L/mol/cm ή 1/M/cm)

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

2.2.16 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο κατά Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάφορα δείγματα. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα, όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα ερυθρό-καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Συνεπώς, η ποσότητα του εν λόγω συμπλόκου που παρουσιάζεται στο διάλυμα αποτελεί μέτρο του προσδιορισμού της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και μπορεί να εκτιμηθεί με τη λήψη μετρήσεων στο φωτόμετρο.

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

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης βασίζεται στη σχέση:

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

όπου:

A απορρόφηση διαλύματος

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

l οπτική διαδρομή (πλάτος κυβέτας) (cm)

c συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg / mL)

$V_{\text{τελ}}$ 50 mL (πάντα)

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

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

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1/4 (ένα μέρος διαλύματος προς τέσσερα μέρη νερού) και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25°C. Για να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, προσθέτουμε 50 μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε 950 μL αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford, ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στην κυψελίδα να είναι 2 – 10 μg . Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 20 min στο σκοτάδι και έπειτα λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm έχοντας ως μάρτυρα αναφοράς (control) διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από την πρωτεΐνη.

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

2.2.17 Αξιολόγηση ενζυμικής καθαρότητας

2.2.17.1 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος (SA)

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

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

2.2.17.2 Υπολογισμός ανάκτησης ενζύμου (%)

Η απόδοση του καθαρισμού δίνεται από τον παρακάτω τύπο (X 100) :

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

2.2.17.3 Καθαρισμός που επετεύχθη (φορές)

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

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

2.2.18 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πραγματοποιείται για να επιβεβαιωθεί ο βαθμός επιτυχίας του καθαρισμού του ενζύμου. Για τον σκοπό αυτό, επιλέγονται τα προϊόντα έκλυσης από τον καθαρισμό, ο μάρτυρας καθώς επίσης και το εκχύλισμα ολικών πρωτεϊνών του μικροοργανισμού. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία του δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) ως αποδιατακτικού παράγοντα. Η ομοιόμορφη δέσμευση του φορτισμένου απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες τις κάνει να αποκτήσουν σταθερό αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα παρουσία ηλεκτρικού πεδίου η κινητικότητά τους να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, το οποίο ρυθμίζεται με τη μεταβολή της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer):

- ❖ 0,025 M Tris
 - ❖ 0,192 M γλυκίνη
 - ❖ 0,1 % (w/v) SDS
- } pH 8,3

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (separating buffer):

- ❖ 3 M Tris-HCl pH 8,8

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking buffer):

- ❖ 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Διάλυμα ακρυλαμίδιου:

- ❖ ακρυλαμίδιο (30 g, 0,42 mol)
 - ❖ N,N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (0,8 g, 5,2 mol)
- διαλυμένα σε 100 mL νερού

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων:

- ❖ 0,125 M Tris-HCl pH 6,8
- ❖ SDS 4 % (w/v)
- ❖ γλυκερόλη 20 % (v/v)
- ❖ β-μερκαπτοαιθανόλη 10 % (v/v)

Διάλυμα SDS 10 % (w/v)

Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 0,1 % (w/v)

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

2.2.18.1 Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Αρχικά, ετοιμάζεται η πηκτική διαχωρισμού πρωτεϊνικών δειγμάτων (separating gel), αναμειγνύοντας 2.935 μL ddH₂O, 2.935 μL διάλυμα ακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 30 % w/v, 875 μL ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating buffer), 170 μL APS, 70 μL

διάλυμα SDS 10 % w/v και 6,24 μ L TEMED. Η διαδικασία αυτή δε πρέπει να διαρκέσει περισσότερο από 2 min, αφού το μείγμα αρχίζει και πήζει. Η πηκτή επωάζεται περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου για να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια, ετοιμάζεται το διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης (stacking gel), το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: 3.450 μ L ddH₂O, 625 μ L ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 30 % w/v, 625 μ L ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (stacking buffer), 250 μ L APS, 50 μ L SDS 10 % w/v και 6,25 μ L TEMED. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτενάκι) ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων (πηγαδάκια). Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε 20–30 min, οπότε αφαιρείται με προσοχή το χτενάκι ώστε να απελευθερωθούν τα πηγαδάκια.

2.2.18.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Η ποσότητα πρωτεΐνης που χρειάζεται για την ηλεκτροφόρηση είναι 20-50 μ g. Για τη συλλογή των ποσοτήτων αυτών, προηγείται προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Παράγραφος 2.2.16). Οι ποσότητες που τοποθετούνται στα πηγαδάκια περιορίζονται στα 20 μ L. Αν οι υπολογιζόμενες ποσότητες είναι μεγαλύτερες, απαιτείται μια προεπεξεργασία των δειγμάτων. Τα προϊόντα των εκλούσεων ψύχονται και στη συνέχεια υφίστανται λυοφιλίωση με σκοπό την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού μέσω εξάχνωσης. Έχοντας έτοιμα τα δείγματα μετά τη λυοφιλίωση, τα αραιώνουμε με 10 μ L νερό και 10 μ L ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής φόρτωσης (loading buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής φόρτωσης αραιώνεται με μερκαπτοαιθανόλη με σκοπό την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Έπειτα, θερμαίνονται στους 95°C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν οι δομές των πρωτεϊνών, ακολουθεί έντονη ανάδευση και στροβίλισμα (spin), αφήνονται για λίγο στον πάγο και ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα πηγαδάκια της πηκτής. Επίσης, χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας (marker) με γνωστά μεγέθη δειγμάτων από τον οποίο φορτώνουμε 5 μ L. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση 25 mA και υπό σταθερή τάση 200 Volts για περίπου δύο ώρες.

ΔΙΑΛΥΜΑ

Διάλυμα χρωστικής φόρτωσης (loading buffer):

- ❖ 50 mM Tris-Cl pH 6,8
- ❖ 100 mM διθειοδιθρεϊτόλη
- ❖ 2 % SDS
- ❖ 0,1 % κυανού της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)
- ❖ 10 % γλυκερόλη

2.2.18.3 Βαφή με τη χρωστική COOMASSIE BLUE R-250

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πολυμερές ('ηλεκτροφόρημα') μεταφέρεται σε ένα πλαστικό δοχείο με προσοχή, ώστε να μη καταστραφεί και εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40 % v/v), οξικό οξύ (7 % v/v) και χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,025-1 % w/v) για περίπου 20 min. Έπειτα, η πηκτή εμβαπτίζεται με το πρώτο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining I), το οποίο αποτελείται από μεθανόλη 40 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v για 1 h. Τέλος, αφού απορριφθεί το πρώτο διάλυμα, εμβαπτίζεται στο δεύτερο διάλυμα αποχρωματισμού (destaining II), το οποίο αποτελείται από μεθανόλη 5 % v/v και οξικό οξύ 7 % v/v, όπου αφήνεται μέχρι την επόμενη ημέρα.

2.2.19 Φωτομετρικός προσδιορισμός πιθανών υποστρωμάτων GSTs

2.2.19.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα παράγωγα νιτροβενζολίου BDNB, IDNB, FDNB, PNBC και NBD-Cl

Η διαδικασία μέτρησης της δραστηριότητας της GST με τα αλογονομένα νιτροβενζόλια 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB), π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (PNBC) και 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) είναι παρόμοια με αυτή που εφαρμόζεται για το πρότυπο υπόστρωμα των ενζύμων GSTs, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου GS-CDNB (Παράγραφος 2.2.14) (Labrou *et al.*, 2001).

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας των υποστρωμάτων IDNB, FDNB, BDNB οι μετρήσεις γίνονται στα 340 nm, όπου απορροφά το σύμπλοκο. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας με το υπόστρωμα PNBC και NBD-Cl οι μετρήσεις γίνονται στα 310 nm και 420 nm, αντίστοιχα.

Για το υπόστρωμα PNBC (1 mM) η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ανέρχεται στα 5 mM και το διάλυμα της αντίδρασης είναι 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 - 1 mM EDTA ενώ για το υπόστρωμα NBD-Cl (0,2 mM) η γλουταθειόνη απαντάται σε 0,5 mM και το διάλυμα της αντίδρασης είναι το 0,1 M CH_3COONa pH 5(τελικός όγκος 2 ml).

2.2.19.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου, τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου και βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίου

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας GST με το υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (CuOOH), το τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (tert-BuOOH) και το βενζοϊκό

υδροϋπεροξειδίου (Benzoyl peroxide) πραγματοποιείται σύμφωνα με τον Tappel, 1978.

Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και προσδιορίζεται η ταχύτητα μετατροπής του NADPH σε NADP⁺, σε μήκος κύματος 340 nm και συντελεστή απόσβεσης $\epsilon = 6,22$ L/mmol·cm. Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσδιορισμού είναι 0,6 mL και περιέχει 1 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 U του ενζύμου ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και 1,5 mM υποστρώματος (CuOOH, tert-BuOOH, Benzoyl peroxide) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου με 0,1 M KH₂PO₄ - 1 mM EDTA pH 7,5.

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

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

2.2.19.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το διϋδροασκορβικό οξύ (DHA)

Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης καταλύει την αντίδραση της αναγωγής του διϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε ασκορβικό, χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη ως δότη ηλεκτρονίων (Mizohata et al., 2001). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 265 nm, με μοριακό συντελεστή απόσβεσης 6,22 L/mmol·cm. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL έχοντας 1 mM GSH, 0,25 mM DHA σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM KH₂PO₄ pH 8.

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

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι του εθακρινικού οξέος (EA) δηλαδή η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου GS-EA (Habig et al., 1974) βασίστηκε στη φωτομετρική μέθοδο του Satoh (1995) όπως περιγράφηκε και από τους Tirona & Pang, 1999. Το εθακρινικό οξύ λόγω του ακόρεστου δεσμού, μπορεί να σχηματίσει διάφορες ενώσεις προσθήκης με νουκλεόφιλες ομάδες. Η αντίδραση προσθήκης του εθακρινικού με τη GSH οδηγεί στον σχηματισμό του συμπλόκου GS-EA.

Κατά παρόμοιο τρόπο, η ακόρεστη ομάδα της trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνης δημιουργεί σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη. Η αντίδραση τελικού όγκου 2 ml, περιέχει 0,25 mM GSH και 0,2 mM ή 0,05 mM υποστρώματος για το εθακρινικό οξύ και η trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, αντίστοιχα σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 6,5. Οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης είναι αντίστοιχα 5 L/mmol·cm και -24,8 L/mmol·cm. Τα υποστρώματα λόγω της χαμηλής διαλυτότητας τους στο νερό διαλύονται σε ακετόνη και αιθανόλη αντίστοιχα. Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί διεξάγονται σε μήκος κύματος 270 nm για το εθακρινικό και 290 nm για την τρανς-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη.

2.2.19.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ως πιθανά υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) και trans-2-ενενάλη (HNE)

Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί για τα δυο υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη και trans-2-ενενάλη διεξάγονται σε μήκη κύματος 330 nm και 224 nm, αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις τελικού όγκου 2 ml, πραγματοποιούνται σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 6,5. Για τη βρωμοσουλφοφθαλεΐνη, το μίγμα της αντίδρασης περιέχει 5 mM GSH και 0,03 mM υποστρώματος και για την trans-2-ενενάλη 0,5 mM GSH και 0,1 mM υποστρώματος. Οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης είναι αντίστοιχα 4,5 L/mmol·cm και 13,75 L/mmol·cm.

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

Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 2 mL είναι ίδιο και για τα δυο υποστρώματα και περιέχει 1 mM GSH και 0,4 mM υποστρώματος σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 6,5. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 274 nm, ενώ πραγματοποιείται σε συνολικό χρόνο 8 min. Οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης είναι αντίστοιχα 8,89 L/mmol·cm και 7,45 L/mmol·cm.

2.2.19.8 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το Fluorodifen

Το μίγμα έχει τελικό όγκο 1 mL, περιέχει 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα Gly-NaOH pH 9,5, 5 mM GSH, 0,05 mM fluorodifen και το υπό μελέτη ένζυμο και επωάζεται για 1h. Μετά το πέρας της επώασης, λαμβάνεται απορρόφηση στα 400 nm που οφείλεται στο σχηματισμό της 4-νιτροφαινόλης. Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή ενός 1 mol fluorodifen σε 4-νιτροφαινόλη ανά min στους 37°C. Για

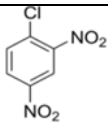
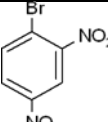
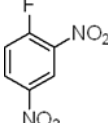
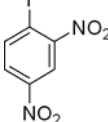
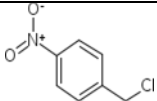
τον ποσοτικό υπολογισμό της 4-νιτροφαινόλης χρησιμοποιείται ως συντελεστής απόσβεσης η τιμή 18,5 L/mmol·cm.

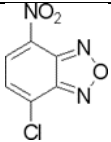
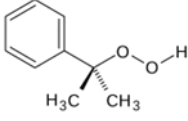
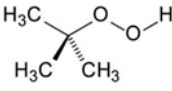
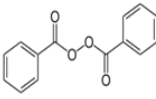
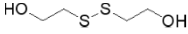
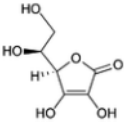
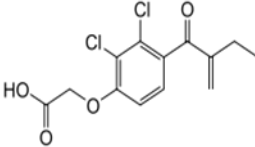
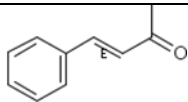
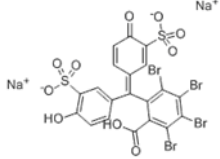

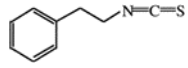
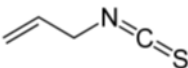
2.2.19.9 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σουλφαναμιδή

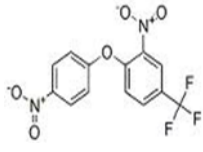
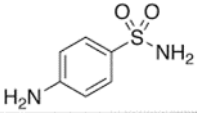
Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 1 mL περιέχει 1 mM GSH και 1 mM υποστρώματος σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 6,5. Η απορρόφηση λαμβάνεται στα 400 nm.

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης κατά την αντίδραση της GSH με τη σουλφαναμιδή μετά από 15 min επώαση στους 37°C. Στην συνέχεια, προστίθεται το αντιδραστήριο Nessler, αφού η αντίδραση βασίζεται στην απελευθέρωση αμμωνίας. Για τον ποσοτικό υπολογισμό της αμμωνίας χρησιμοποιείται ως συντελεστής απόσβεσης η τιμή 4,23 L/mmol·cm.

Πίνακας 2.5: Πιθανά υποστρώματα του ενζύμου GST, οι δομές τους, το μήκος κύματος παρακολούθησης της αντίδρασης και ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης.

| Υπόστρωμα | Δομή | λ_{\max} (nm) | Συντελεστής Μοριακής Απόσβεσης (L/mmol*cm) |
|------------------------------------|---|-----------------------|--|
| 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) |  | 340 | 9.6 |
| 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) |  | 340 | 9.6 |
| 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB) |  | 340 | 9.6 |
| 1-ιώδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) |  | 340 | 9.6 |
| π-νιτροβένζυλ-χλωρίδιο (PNBC) |  | 310 | 1.9 |

| | | | |
|---|---|-----|-------|
| 4-χλωρο-7-νιτροβενζο- 2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) |  | 420 | 14.5 |
| Υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου (CuOOH) |  | 340 | 6.22 |
| t-βούτυλο- υδροϋπεροξειδίο (tert- BuOOH) |  | 340 | 6.22 |
| Βενζοϊκό υροϋπεροξειδίο (benzoyl peroxide) |  | 340 | 6.22 |
| 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) |  | 340 | 6.22 |
| Διυδροασκορβικό οξύ (DHA) |  | 265 | 6.22 |
| Εθακρινικό οξύ (EA) |  | 270 | 5 |
| trans-4-φαινυλβουτ-3- εν-2-όνη |  | 290 | -24.8 |
| Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) |  | 330 | 4.5 |
| Trans-2-ενεάλη (HNE) |  | 224 | 13.75 |
| Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) |  | 274 | 8.89 |
| Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC) |  | 274 | 7.45 |

| | | | |
|----------------|---|-----|------|
| Fluorodifen |  | 400 | 18.5 |
| Σουλφανιλαμίδη |  | 540 | 4.23 |

2.2.20 Κινητική μελέτη του ενζύμου έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση),
- **CDNB:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης,
- **Ένζυμο:** αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος).

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη Παράγραφο 2.2.14 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

2.2.21 Κινητική μελέτη του ενζύμου έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
- **Ένζυμο:** αραιωμένο ή μη (ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος)

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη Παράγραφο 2.2.14 με σταθερές τις

συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

2.2.22 Σάρωση βιβλιοθήκης ενώσεων για την διαπίστωση δράσης αναστολέα του ενζύμου

Η σάρωση μιας βιβλιοθήκης ενώσεων αποσκοπεί στην αξιολόγηση ενός συνόλου ενώσεων, που στοχεύουν στην ανασταλτική δράση τους έναντι της λειτουργικότητας του ενζύμου. Οι σχετικοί προσδιορισμοί πραγματοποιούνται φασματοφωτομετρικά, για χρονικό διάστημα κατάλληλο, το οποίο δίνει το ρυθμό μεταβολής της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου, στο γραμμικό τμήμα της αντίδρασης.

Ο προσδιορισμός της δράσης του αναστολέα πραγματοποιείται όπως πραγματοποιείται ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας (Παράγραφος 2.2.14) με ταυτόχρονη προσθήκη του πιθανού αναστολέα σε συγκέντρωση 100 μM . Το αποτέλεσμα υπολογίζεται σαν Παραμένουσα Δραστηριότητα (RA %, *Remaining Activity*). Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο παρακάτω:

$$\text{RA (\%)} = \left[\frac{\left[\frac{\Delta A}{\Delta t} \right]_{\text{Με αναστολέα}}}{\left[\frac{\Delta A}{\Delta t} \right]_{\text{Χωρίς αναστολέα}}} \right]$$

Η βιβλιοθήκη των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή αποτελείται από διάφορες φυτοπροστατευτικές ενώσεις.

2.2.23 Υπολογισμός της συγκέντρωσης IC50

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

Οι δοκιμές και σε αυτή την περίπτωση είναι φασματοφωτομετρικές και χαρακτηρίζονται από τις σταθερές συγκεντρώσεις των βασικών υποστρωμάτων, κατά τις δοκιμές προσδιορισμού και μεταβαλλόμενη τη συγκέντρωση του αναστολέα. Το αποτέλεσμα της κάθε δοκιμής κρίνεται βάσει της δοκιμής αναφοράς και υπολογίζεται το RA % στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα.

Τα αποτελέσματα αναλύονται στο πρόγραμμα επεξεργασίας Grafit, όπου με τη χρήση των κατάλληλων παραμέτρων υπολογίζεται η τιμή της ζητούμενης συγκέντρωσης που δίνει 50 % αναστολή.

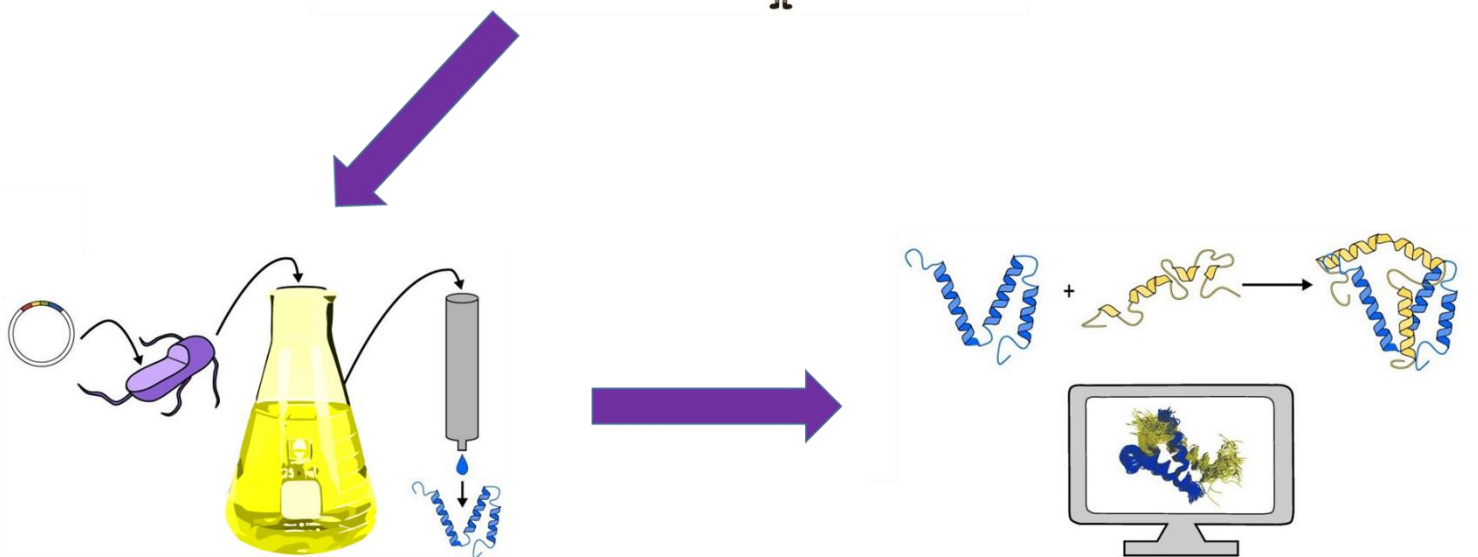
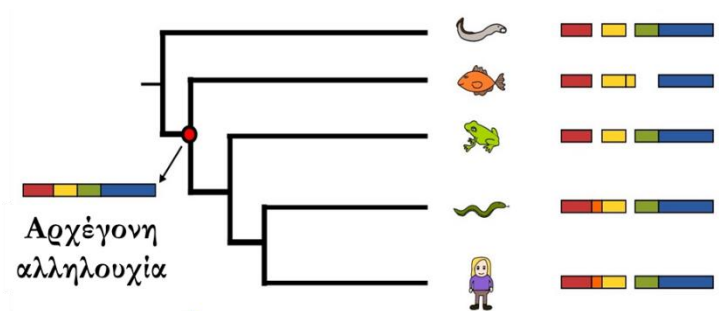
2.2.24 Κινητική μελέτη αναστολής

Η κινητική μελέτη αναστολής μιας ένωσης πραγματοποιείται προκειμένου να προσδιοριστεί το είδος της αναστολής (συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή) που προκαλείται στην ομαλή λειτουργία ενός ενζύμου υπό την επίδρασή της. Η πειραματική διαδικασία είναι η ίδια που ακολουθείται στην απλή κινητική μελέτη (Παράγραφοι 2.2.20 και 2.2.21).

Πραγματοποιούνται πειράματα προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας μεταβάλλοντας ένα από τα δυο υποστρώματα, απουσία ή παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα. Η συγκέντρωση του αναστολέα παραμένει σταθερή για κάθε καμπύλη κινητικής. Τα γραφήματα της κάθε κινητικής μελέτης παρουσιάζονται συνολικά σε ένα ενιαίο γράφημα υπό τη μορφή των διπλών αντιστρόφων. Το σημείο τομής των ευθειών ανάλογα με το τεταρτημόριο που βρίσκεται υποδεικνύει το είδος της αναστολής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ GSTs



3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1.1 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση είναι το μέσο με το οποίο μελετάται η εξελικτική ιστορία των οργανισμών και είναι πολύ σημαντική αφού μας βοηθά να κατανοήσουμε και να ταξινομήσουμε την ποικιλότητα που υπάρχει. Η φυλογενετική ανάλυση βασίζεται σε μια ευρέως διαδεδομένη άποψη του τρόπου εξέλιξης, η οποία εξηγεί ότι τα είδη εξελίσσονται αφού υφίστανται τροποποίηση των χαρακτηριστικών τους με την πάροδο του χρόνου. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να σχετίζονται είτε με τον φαινότυπο (κύτταρα, ιστοί, όργανα) είτε με τον γενότυπο (πρωτεΐνες, DNA, RNA) του είδους (Morrison, 2013). Στην φυλογένεση, τα χαρακτηριστικά αυτά ονομάζονται χαρακτήρες και μπορεί να είναι μορφολογικοί, χρωμοσωμικοί, μοριακοί ή οικολογικοί. Κάθε είδος αποτελείται από δυο τύπους χαρακτήρων: τους προγονικούς (ancestral), οι οποίοι διατηρούνται χωρίς καμία ή με πολύ μικρή διαφορά σε σχέση με τους μακρινούς προγόνους και τους παράγωγους (derived), οι οποίοι έχουν προέλθει από πρόσφατες αλλαγές (Szalay & Delson, 1979). Συνήθως, οι χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται ως φυλογενετικοί δείκτες είναι αυτοί που αλλάζουν σπάνια, ενώ οι χαρακτήρες που αλλάζουν συχνά ή εξελίσσονται με ταχύ ρυθμό αποφεύγονται καθώς διαταράσσουν την ανακατασκευή της φυλογένεσης (Poe, 2005).

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται οι γενότυποι για την φυλογενετική ανάλυση πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν τόσο η "οριζόντια" όσο και η "κάθετη" ροή γενετικής πληροφορίας. Ως "κάθετη" ροή ορίζεται η κληροδότηση των χαρακτηριστικών από τους προγόνους στους απογόνους, ενώ η "οριζόντια" ροή αναφέρεται στα χαρακτηριστικά που έχουν προκύψει από φαινόμενα όπως ο ανασυνδυασμός (Morrison, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, με το πλήθος γενετικών δεδομένων που έχει αποκωδικοποιηθεί θα ήταν αδύνατο να υπάρξει κάποιου είδους διαχείριση χωρίς την ανάπτυξη της βιοπληροφορικής. Η ανάπτυξη αυτού του κλάδου οδήγησε ταυτόχρονα στην δημιουργία νέων δεδομένων αναφορικά με την ταξινόμηση των ειδών αλλά έδωσε επίσης την ευκαιρία να γίνει αναπαράσταση των εξελικτικών ιστοριών με φυλογενετικά ή εξελικτικά δέντρα (Thanukos, 2009). Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων και δίνει σημαντικές πληροφορίες για τα προγονικά γονίδια (Kemp, 2005). Η σημαντικότητα της φυλογενετικής ανάλυσης φαίνεται από το γεγονός ότι χρησιμοποιείται τόσο για την πρόβλεψη και την αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών όσο και για την κατανόηση των συνθηκών υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η εξέλιξη (Losos, 2011).

3.1.2 Αναβίωση Αρχέγονων Αλληλουχιών

Η αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών είναι μια υπολογιστική μέθοδος πρόβλεψης αλληλουχιών από υπαρκτά είδη (Holinski *et al.*, 2017) και είναι ιδιαίτερα δημοφιλής αφού δίνει την δυνατότητα να μελετηθεί η εξελικτική ιστορία των πρωτεϊνικών λειτουργιών (Chang *et al.*, 2005). Πρώτοι οι Pauling & Zuckerkandl αναφέρθηκαν στην αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών από υπάρχοντες οργανισμούς το 1963, υποστηρίζοντας ότι κάποια μέρα θα μπορούν να συντεθούν και να μελετηθούν αρχέγονες πρωτεΐνες, δίνοντας εξαιρετικές πληροφορίες για την πορεία εξέλιξης τους (Pauling & Zuckerkandl, 1963). Λίγες δεκαετίες αργότερα, η αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών είναι πλέον μια μέθοδος ευρέως γνωστή και χρησιμοποιούμενη προκειμένου να μελετηθούν πολλές οικογένειες πρωτεϊνών, παραδείγματος χάριν οι GFPs (Field & Matz, 2010) και η οικογένεια C των GPCRs (G-Protein Coupled Receptors) (Kuang *et al.*, 2006). Η μέθοδος ανακατασκευής αρχέγονων αλληλουχιών έχει επίσης χρησιμοποιηθεί προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι φαρμακολογικές ιδιότητες του πηκτικού παράγοντα VIII (Zakas *et al.*, 2017).

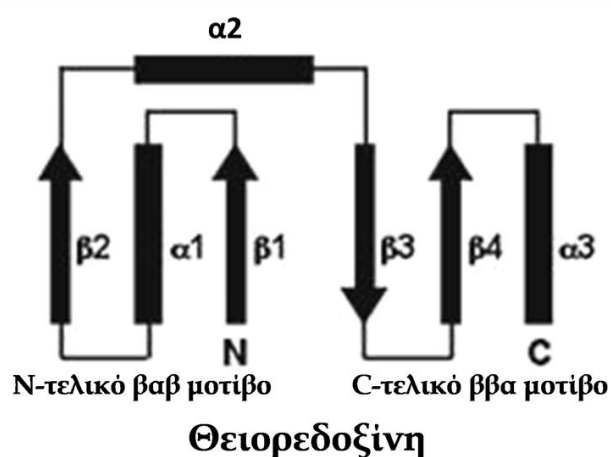
Επιπλέον, βοηθά να βρεθούν τα αμινοξέα-κλειδιά σε μια πρωτεΐνη. Η "οριζόντια" ήταν η συνήθης μέθοδος εύρεσης των σημαντικών αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη, δηλαδή εισαγωγή μεταλλάξεων και παρακολούθηση των αλλαγών στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είχε συχνά προβλήματα, αφού σε πολλές περιπτώσεις οι τροποποιημένες πρωτεΐνες δεν ήταν λειτουργικές. Έτσι, κέρδισε έδαφος η "κάθετη" μέθοδος, δηλαδή η αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών, με την οποία μπορεί επίσης να γίνει χρονολόγηση των μεταλλάξεων. Τα αρχέγονα γονίδια που προκύπτουν αποτελούν το κατάλληλο υπόβαθρο για τη μελέτη της εξέλιξης των σημαντικών αμινοξέων (Harms & Thornton, 2010). Επιπλέον, οι νέες τεχνολογίες σύνθεσης γονιδίων μπορούν να συνδυαστούν με τις βιοϋπολογιστικές τεχνικές, με αποτέλεσμα οι αρχέγονες αλληλουχίες που θα προκύψουν να μελετηθούν τόσο με βιοχημικές όσο και βιοφυσικές μεθόδους.

Ωστόσο, η αναβίωση των αρχέγονων αλληλουχιών δε δίνει μόνο πληροφορίες για τις μεταλλάξεις που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες αλλά καθιστά επίσης δυνατή την παρακολούθηση των αλλαγών στις καταλυτικές ιδιότητές τους, όπως είναι η εξειδίκευση των υποστρωμάτων ή ακόμα και η εμφάνιση νέων ή/και πιο εξειδικευμένων λειτουργιών στη διάρκεια της εξελικτικής πορείας, έχοντας υπόψιν τις περιβαλλοντικές και εξελικτικές δυνάμεις που τις διαμόρφωσαν (Trudeau *et al.*, 2016).

Η αναβίωση αρχέγονων αλληλουχιών χρησιμοποιείται επίσης προκειμένου να χαρακτηριστεί η εκλεκτικότητα των αρχέγονων ενζύμων αλλά και η μακροβιότητα των

μεταλλάξεων που συμβαίνουν μέσω της εξέλιξης (Merkl & Sterner, 2016; Wheeler *et al.*, 2016; Risso *et al.*, 2015).

Οι θειορεδοξίνες ανήκουν σε μια τεράστια οικογένεια ενζύμων και βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς (Arts *et al.*, 2016). Το ενεργό κέντρο καθώς και η αναδίπλωση της είναι πολύ καλά συντηρημένα παρά την πάροδο των ετών, γεγονός που υποδεικνύει ότι ίσως υφίσταται από αρχαίες εποχές (Perez-Jimenez *et al.*, 2011). Η αναδίπλωση της θειορεδοξίνης είναι μια δομική αναδίπλωση κοινή σε πολλές πρωτεΐνες (Εικόνα 3.1), ικανές να εκτελέσουν διαφορετικές λειτουργίες, όπως είναι οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, οι γλουταρεδοξίνες, οι περοξειδάσες κ.α. (Copley *et al.*, 2004).



Εικόνα 3.1: Διάταξη της δευτεροταγούς δομής της θειορεδοξίνης. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως κύλινδροι, ενώ οι β-πτυχωτές επιφάνειες ως βελάκια.

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των GST αλληλουχιών από όλες τις γνωστές τάξεις και πρόβλεψη και σχεδιασμός πέντε αρχέγονων μορφών του ενζύμου GST, προκειμένου να μελετηθούν οι καταλυτικές λειτουργίες και οι δομικές διαφορές με τις σύγχρονες μορφές του ενζύμου.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Βιολογικά υλικά

Στο πλαίσιο των πειραμάτων του Κεφαλαίου 3, εκφραστικά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) pLysS, *E.coli* (C41) και *E.coli* BL21 Rosetta χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης.

Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση GST αλληλουχιών

Για τα πειράματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των GST αλληλουχιών στις οποίες συμπεριλήφθηκαν όλες οι γνωστές τάξεις. Πιο συγκεκριμένα, στα θηλαστικά χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα των τάξεων: *alpha* (A), *mu* (M), *pi* (P), *sigma* (S), *theta* (T), *zeta* (Z), *kappa* (K), *ro* (R) και *omega* (O), στα έντομα: *delta* (D) και *epsilon* (E), στα φυτά: *phi* (F), *tau* (U), *lamda* (L) και στα βακτήρια: *beta* (B) και *chi* (X). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες της *tau* τάξης από *Glycine max* και *Agrobacterium tumefaciens*.

Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά εργαλεία αναζήτησης ομοιότητας (BLAST) σε βιολογικές βάσεις δεδομένων (NCBI), πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (MUSCLE , T-Coffee , CLUSTAL W, OMEGA) και φυλογενετική ανάλυση (PhyML, Gblocks, TreeDyn).

3.2.3 Ανάλυση αρχέγονων αλληλουχιών με το πρόγραμμα FASTML

Το πρόγραμμα FastML (<http://fastml.tau.ac.il/overview.php>) είναι ένα βιοϋπολογιστικό εργαλείο για τον σχεδιασμό αρχέγονων αλληλουχιών και βασίζεται στη φυλογενετική σχέση μεταξύ ομόλογων ακολουθιών (Ashkenazy *et al.*, 2012). Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί διάφορους αλγόριθμους που σχεδιάζουν τις αρχέγονες αλληλουχίες με έμφαση στον ακριβή σχεδιασμό τόσο εισαγωγών ή διαγραφών (indels) όσο και χαρακτήρων. Για την κατασκευή χαρακτήρων, οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται δίνουν την πιο πιθανή αλληλουχία για κάθε εσωτερικό κλάδο του φυλογενετικού δέντρου. Για ανακατασκευή indel, οι αλληλουχίες πρώτα κωδικοποιούνται σύμφωνα με τις εισαγωγές ή διαγραφές που ανιχνεύονται από πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ένα μοντέλο που βάσει πιθανοτήτων ανακατασκευάζει τις αρχέγονες εισαγωγές ή διαγραφές. Τα αποτελέσματα που δίνει το πρόγραμμα είναι οι πιο πιθανές αλληλουχίες, δίνοντας μαζί και τις πιθανότητες για κάθε κλάδο του φυλογενετικού

δέντρου. Το FastML είναι ένα πρόγραμμα γενικό και εφαρμόζεται σε όλους τους τύπους μοριακών ακολουθιών (νουκλεοτιδικές, πρωτεϊνικές ή αλληλουχίες κωδικονίων).

3.2.3.1 Μεθοδολογία

Αφού γίνει πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν και δοθεί το φυλογενετικό δέντρο, η διαδικασία της αρχέγονης ανακατασκευής μπορεί να διαιρεθεί σε δυο τμήματα:

A) Ανακατασκευή χαρακτήρων

Εφαρμόζονται δυο διαφορετικές μέθοδοι: η κοινή (joint) και η οριακή (marginal). Στην κοινή (joint), βρίσκει κανείς το σύνολο όλων των ακολουθιών των εσωτερικών κλάδων. Στην οριακή (marginal) ανακατασκευή, βρίσκει κανείς την πιο πιθανή αλληλουχία σε έναν συγκεκριμένο εσωτερικό κλάδο. Τα αποτελέσματα αυτών των δυο μεθόδων δεν είναι απαραίτητα τα ίδια. Ωστόσο, και οι δυο μέθοδοι βασίζονται στον αλγόριθμο της μεγαλύτερης πιθανότητας και σε μια εμπειρική Bayesian προσέγγιση που λαμβάνει υπόψιν το εύρος της ποικιλίας μεταξύ των τόπων από την πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών. Οι δύο αυτές μέθοδοι ανακατασκευής αρχέγονων αλληλουχιών μπορεί να διαφέρουν σε κάποιες περιπτώσεις. Στην marginal ανακατασκευή, η πιο πιθανή ακολουθία σε ένα συγκεκριμένο εσωτερικό κόμβο βρίσκεται κάνοντας μέσο όρο όλων των πιθανών αρχέγονων καταστάσεων από όλους τους άλλους κόμβους. Ωστόσο, στην joint ανασυγκρότηση, η πιο πιθανή ομάδα αρχέγονης κατάστασης βρίσκεται από όλους τους κόμβους. Παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις μπορούν να εφαρμοστούν και οι δυο τύποι ανακατασκευής για μεγάλα σύνολα δεδομένων, απενεργοποιώντας την joint μέθοδο μπορεί να επιταχυνθεί ο αλγόριθμος.

B) Ανακατασκευή indels

Χρησιμοποιείται μια προσέγγιση δυο βημάτων προκειμένου να ληφθεί υπόψιν η εξάρτηση μεταξύ των τόπων.

i. Κωδικοποίηση indels

Σε αυτό το βήμα, η εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης αλληλουχιών είναι κωδικοποιημένο σε ένα δυαδικό σύστημα matrix. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί μια αποτελεσματική εφαρμογή της απλής κωδικοποίησης indels, σύμφωνα με την οποία κάθε indel με διαφορετική θέση αρχής ή/και τέλους θεωρείται ότι είναι ένας

ξεχωριστός χαρακτήρας. Στα δεδομένα, κάθε indel είναι κωδικοποιημένο ως δυαδικός χαρακτήρας (παρουσία, απουσία), καθένα απ τα οποία μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα κενό πολλαπλών θέσεων.

ii. Ανακατασκευή indels

Στο συγκεκριμένο βήμα, πραγματοποιείται η εξελικτική ανάλυση των indels. Δεδομένης της παρουσίας και απουσίας δυαδικού συστήματος των indels στις υπάρχουσες αλληλουχίες, οι αλγόριθμοι ανακατασκευάζουν την αρχέγονη κατάσταση κάθε indel σε κάθε εσωτερικό κόμβο του φυλογενετικού δέντρου. Υποτίθεται ότι το παρατηρούμενο πρότυπο των indels είναι αποτέλεσμα δυναμικών διαγραφών και εισαγωγών κατά μήκος ενός φυλογενετικού δέντρου. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται σε ένα μοντέλο πιθανοτήτων, το οποίο επιτρέπει διάφορους ρυθμούς εισαγωγών και διαγραφών μεταξύ των indels προκειμένου να υπολογιστούν αξιόπιστα οι υποκείμενες εξελικτικές διαδικασίες. Σε αυτήν την προσέγγιση, η πιθανότητα παρουσίας indel υπολογίζεται για κάθε indel και κάθε κόμβο. Εναλλακτικά, οι χρήστες μπορούν να επιλέξουν να ανακατασκευάσουν τις αρχέγονες καταστάσεις indel με βάση τη προσέγγιση της μέγιστης φειδωλότητας. Η φειδωλή αρχέγονη ανακατασκευή βασίζεται στον αλγόριθμο του Sankoff και η παρουσία indel υπολογίζεται για κάθε indel και κάθε εσωτερικό κόμβο. Διαφορετικές αλληλουχίες που ανήκουν σε διαφορετικές κλάσεις αποθηκεύτηκαν σε μορφή FASTA και τροφοδότησαν το πρόγραμμα FASTML, όπου έγινε ο βιοϋπολογιστικός σχεδιασμός των αρχέγονων αλληλουχιών. Οι μέθοδοι ανακατασκευής αρχέγονων αλληλουχιών MARGINAL vs JOINT που μπορούν να εφαρμοστούν μπορεί να διαφέρουν σε κάποιες περιπτώσεις. Στην marginal ανακατασκευή, η πιο πιθανή ακολουθία σε ένα συγκεκριμένο εσωτερικό κόμβο βρίσκεται κάνοντας μέσο όρο όλων των πιθανών αρχέγονων καταστάσεων από όλους τους άλλους κόμβους. Ωστόσο, στην joint ανασυγκρότηση, η πιο πιθανή ομάδα αρχέγονης κατάστασης βρίσκεται από όλους τους κόμβους.

3.2.4 Σχεδιασμός των αρχέγονων αλληλουχιών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φυλογενετικής και βιοϋπολογιστικής ανάλυσης, συντέθηκαν πέντε αρχέγονες αλληλουχίες (N1 ANCIENT, N10 *AtuGST*, N20 ANCIENT, N1 TAU) καθώς και μια αλληλουχία GST από τον οργανισμό *Thermosynechococcus elongatus*, ενός θερμόφιλου μονοκύτταρου κυανοβακτηρίου. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Life Technologies (USA).

3.2.5 Υποκλωνοποίηση των αρχέγονων αλληλουχιών σε πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR προκειμένου να απομονωθούν οι αρχέγονες αλληλουχίες.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 µL και περιείχαν:

- 10 pmol από κάθε εκκινητή
- 1 µg μήτρα DNA
- 0,5 mM dNTPs
- 10 µL από 5X ρυθμιστικό διάλυμα Kara HiFi
- 1 U Kara HiFi DNA πολυμεράση

και αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.

Πίνακας 3.1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την απομόνωση των γονιδίων.

| ENZYMΟ | | ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (5'→3') |
|--------------------|-------------|---|
| <i>N1 ANCIENT</i> | ΕΥΘΥΣ | CAT CAT CAT CAC CAC AAA CTG TAT GGT GC |
| | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ | ACG TTC TGC TTC CAG AAC TTT CTG AAA TGC C |
| <i>N10 AtuGST</i> | ΕΥΘΥΣ | ATG CAT CAT CAT CAT CAC CAT ACC CCG |
| | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ | TTA GCT GCT TGC TGC GGT AAA AAC TG |
| <i>N20 ANCIENT</i> | ΕΥΘΥΣ | ATG CAT CAT CAT CAT CAC CAT AGC GGT GAA A |
| | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ | TTA CAG GCC ATA TTT ACA TTT TTC CGG ACT TTT CTG C |
| <i>N1 TAU</i> | ΕΥΘΥΣ | ATG CAT CAT CAT CAT CAC CAT GCC G |
| | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ | TTA GGC ACC CAC ATA TTC GAT GCC |
| <i>ThermoGST</i> | ΕΥΘΥΣ | CAT CAT CAT CAC CAT CAC CTG AAA CTG TAT GGT GG |
| | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ | TGC ACG TGC ACC CAT CAG ACC TTT CTG |

Οι συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR εμφανίζονται παρακάτω (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Συνθήκες PCR για την απομόνωση των αρχέγονων αλληλουχιών.

| ΣΤΑΔΙΑ | <i>N1 ANCIENT</i> | <i>N1 TAU</i> | <i>N10 AtuGST</i> | <i>N20 ANCIENT</i> | <i>THERMOGST</i> |
|-------------------|-------------------|----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C για 180 s | | | 95°C για 180 s | |
| Αποδιάταξη | 94°C για 15 s | 94°C για 30 s | 95°C για 60 s | 95°C για 60 s | 95°C για 15 s |
| Υβριδισμός | 57°C για 30 s | 62°C για 45 s | 55°C για 90 s | 57°C για 90 s | 65°C για 30 s |
| Επιμήκυνση | 68°C για 60 s | 72°C για 90 s | | 72°C για 60 s | |
| Τελική επιμήκυνση | 68°C για 600 s | 72°C για 600 s | | 72°C για 600 s | |
| Κύκλοι | 30 | | | 25 | |

Μετά την απομόνωση των γονιδίων, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.12. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

3.2.6 Μετασηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων σε στελέχη κυττάρων *E. coli*

Κατόπιν μετασηματισμού κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, *E. coli* (C41) και *E. coli* BL21 Rosetta με πλασμιδιακό DNA, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB έχοντας ως μέσο επιλογής αμικικιλίνη (100 µg/mL) και χλωραμφαινικόλη (33 µg/mL) (για την κυτταρική καλλιέργεια με τα *E. coli* BL21 Rosetta). Ο μετασηματισμός και η ετερόλογος έκφραση πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφοι 2.14 και 2.15, αντίστοιχα.

3.2.7 Καθαρισμός των ενζύμων

Τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις καθαρισμού εφαρμόστηκαν προκειμένου να καθαριστούν τα συνθετικά αρχέγονα GST ένζυμα. Αρχικά, εφαρμόστηκε μεταλλοχηλική χρωματογραφία στήλης, λόγω του άκρου με τις έξι ιστιδίνες (6-His tag). Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε χρωματογραφία συγγένειας και τέλος χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αναλυτικά, αναφέρονται οι διαδικασίες στις επόμενες παραγράφους.

3.2.7.1 Καθαρισμός μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας έχοντας ως προσροφητή Ni-NDA

Τα συνθετικά ένζυμα σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν στο N-τελικό τους άκρο επίτοπο 6-His, ώστε να πραγματοποιηθεί καθαρισμός μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-NDA. Η μεταλλοχηλική χρωματογραφία εκμεταλλεύεται την ικανότητα των αμινοξικών καταλοίπων His, να συμπεριφέρονται ως δότες ηλεκτρονίων προς μεταλλοκατιόντα-δέκτες ηλεκτρονίων, συγκεκριμένα το Ni²⁺. Το μεταλλοκατιόν (Ni²⁺) σχηματίζει χηλικό σύμπλοκο με το ιμινοδιοξικό οξύ, το οποίο συγκρατεί ισχυρά το μεταλλοκατιόν μέσω δεσμών συναρμογής που μετέχουν τα καρβοξυλικά οξυγόνα και το άζωτο, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος καταλαμβάνονται προσωρινά από μόρια νερού. Τα αμινοξέα με χαρακτήρα δότη ηλεκτρονίων (π.χ. His) αλληλεπιδρούν με τις θέσεις του μεταλλοκατιόντος που καταλαμβάνονται από μόρια νερού και έτσι το ένζυμο δεσμεύεται στον προσροφητή. Τέλος, η έκλυση του ενζύμου επιτυγχάνεται με την προσθήκη ιμιδαζολίου, το οποίο

λειτουργεί συναγωνιστικά έναντι των ιστιδινών. Στην Εικόνα 3.2 φαίνονται τα στάδια και η διαδικασία που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-NDA (1 mL).



Εικόνα 3.2: Στάδια καθαρισμού μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας.

3.2.7.2 Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας

Η διαδικασία καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.19.

3.2.7.3 Καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιώντας κατιοντικό προσροφητή (DEAE-Sepharose)

Η παρουσία φορτισμένων αμινοξέων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης δίνει την δυνατότητα, υπό ορισμένες συνθήκες, να προσροφηθεί αντιστρεπτά σε χρωματογραφικό υλικό που φέρει αντίθετα φορτία (ιοντοανταλλάκτης). Ο ιοντοανταλλάκτης φέρει είτε ανιοντικές καρβοξυλομάδες είτε κατιοντικές τριτοταγείς αμινομάδες, χημικά δεσμευμένες στο πολυμερές των χρωματογραφικών μικροσφαιριδίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε Sepharose με θετικά φορτισμένο ιοντοανταλλάκτη, [DEAE-Sepharose (διαιθυλοαιθυλαμίνη)], η οποία εμφανίζεται εξουδετερωμένη, καθώς φέρει αρνητικά φορτισμένα ιόντα Cl⁻ (αντισταθμιστικό ιόν). Όταν το φορτίο του υπό εξέταση ενζύμου

είναι αντίθετο από αυτό του ιοντοανταλλάκτη συναγωνίζονται και απομακρύνουν το αντισταθμιστικό ιόν, με αποτέλεσμα το ένζυμο να προσροφάται. Στην Εικόνα 3.3, φαίνονται τα στάδια και η διαδικασία που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ως προσροφητή DEAE-Sepharose (1 mL).



Εικόνα 3.3: Στάδια καθαρισμού χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής DEAE-Sepharose.

3.2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο κατά Bradford και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας των αρχέγονων ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.22. Όσον αφορά στον προσδιορισμό δραστηριότητας των ενζύμων, πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20, χρησιμοποιώντας ωστόσο το 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) αντί του 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB). Προκειμένου να μελετηθεί η καταλυτική ποικιλότητα των ενζύμων, πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικοί προσδιορισμοί ως προς διάφορες ενώσεις που δυνητικά λειτουργούν ως υποστρώματα των GSTs. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.25.

3.2.9 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα BDNB και GSH

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση),
- **BDNB:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - N1 Ancient: 0,09 - 3,1 mM
 - N10 *Atu*GST: 0,3 – 2,1 mM
 - N20 Ancient: 0,27 - 2,1 mM
 - *Thermo*GST: 0,1125 – 2.100 mM
 - N1 Tau: 0,18 – 1,75 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (BDNB).

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **BDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - N1 Ancient: 0,3 – 3,5 mM
 - N10 *Atu*GST: 0,125 – 3,5 mM
 - N20 Ancient: 0,25 – 3,5 mM
 - *Thermo*GST: 0,2 – 4,5 mM
 - N1 Tau: 0,08 – 3,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2, παράγραφο 2.20 με σταθερές τις

συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

3.2.10 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων

Ο ρόλος της θερμοκρασίας είναι πολύ σημαντικός, αφού επιφέρει διάφορες αλλαγές στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου (Κλώνης, 2007). Κάποιοι παράγοντες που επηρεάζονται σημαντικά είναι η στερεοδομή του ενζύμου, η σταθερότητα, η διαλυτότητα, η συγγένεια των υποστρωμάτων με το ένζυμο κ.α.

Για τα πειράματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι του υποστρώματος BDNB σε θερμοκρασιακό εύρος:

- 40 – 65°C για το N1 Ancient
- 45 – 62,5°C για το N10 *AtuGST*
- 35 – 67,5°C για το N20 Ancient
- 45 – 62°C για το *ThermoGST*
- 40 – 60°C για το N1 Tau

σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η υπολειπόμενη δραστηριότητα (%) ύστερα από επώαση 5 min σε κάθε θερμοκρασία.

3.2.11 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης για το ένζυμο N1 Ancient

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα αντίδρασης του ενζύμου N1 Ancient και να βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας σε ένα εύρος θερμοκρασιών (4 – 55°C).

3.2.12 Μελέτη της επίδρασης του pH στην ταχύτητα της αντίδρασης για τα ένζυμα N1 Ancient και N1 Tau

Η επίδραση του pH στην ταχύτητα της αντίδρασης μελετήθηκε με φωτομετρικές δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών σε ένα εύρος pH (4,5 – 7,6 για το N1 Ancient και 5,2 - 8,2 για το N1 Tau).

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 Φυλογενετική ανάλυση και βιοϋπολογιστικός σχεδιασμός αρχέγονων αλληλουχιών

Αρχικά, επιλέχθηκαν ομόλογες αλληλουχίες με τις αντίστοιχες που μας ενδιαφέρουν από τη βάση δεδομένων NCBI μέσω του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Στον Πίνακα 3.3, φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες που επιλέχθηκαν και ανήκουν σε όλες τις τάξεις των GSTs. Έπειτα, έγινε πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών (Εικόνα 3.4) με τη χρήση του προγράμματος ClustalW. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συνολικά οι GSTs διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Στην Εικόνα 3.5, παρουσιάζεται η φυλογενετική ανάλυση των ισοενζύμων GST.

Πίνακας 3.3: Οργανισμοί προέλευσης, οι αριθμοί καταχώρησης τους και η τάξη τους.

| Οργανισμός Προέλευσης | Τάξη | Αριθμός καταχώρησης |
|---------------------------------------|---------|---------------------|
| <i>Mus musculus</i> | Alpha | NP_034487.2 |
| <i>Gallus gallus</i> | Alpha | NP_001001777.1 |
| <i>Mannheimia haemolytica</i> | Beta | WP_006248215.1 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | Beta | WP_004263858.1 |
| <i>Anopheles cracens</i> | Delta | IJLV_A |
| <i>Culex quinquefasciatus</i> | Delta | XP_001844244.1 |
| <i>Drosophila sechellia</i> | Delta | XP_002031492.1 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Epsilon | NP_611323.1 |
| <i>Capsicum chinense</i> | Phi | CAI51314.2 |
| <i>Solanum commersonii</i> | Phi | ABQ96852.1 |
| <i>Zea mays</i> | Phi | NP_001105412.1 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | Kappa | NP_852036.1 |
| <i>Mus musculus</i> | Kappa | NP_083831.1 |
| <i>Homo sapiens</i> | Kappa | NP_057001.1 |
| <i>Medicago truncatula</i> | Lamda | ACJ84312.1 |
| <i>Rheum austral</i> | Lamda | ACH63212.1 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Lamda | NP_195899.1 |
| <i>Mus musculus</i> | Mu | EDL01935.1 |
| <i>Homo sapiens</i> | Mu | NP_000840.2 |
| <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | Mu | AAX37326.1 |
| <i>Homo sapiens</i> | Omega | NP_004823.1 |
| <i>Mus musculus</i> | Omega | NP_080895.2 |
| <i>Sus scrofa</i> | Omega | NP_999215.1 |

| | | |
|--------------------------------------|-------|----------------|
| <i>Homo sapiens</i> | Pi | NP_000843.1 |
| <i>Mus musculus</i> | Pi | NP_038569.1 |
| <i>Capra hircus</i> | Pi | AAF01323.1 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | Ro | ABD67511.1 |
| <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | Ro | ABV24478.1 |
| <i>Danio rerio</i> | Ro | NP_001038525.1 |
| <i>Nototodarus sloanii</i> | Sigma | P46088.1 |
| <i>Anopheles gambiae</i> | Sigma | XP_311546.4 |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | Sigma | NP_001254267.1 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Sigma | XP_001699262.1 |
| <i>Homo sapiens</i> | Theta | NP_000844.2 |
| <i>Bos Taurus</i> | Theta | NP_001039697.1 |
| <i>Macaca mulatta</i> | Theta | XP_001089367.1 |
| <i>Oryza sativa Indica Group</i> | Tau | A2XMN2.1 |
| <i>Oryza sativa Japonica Group</i> | Tau | EAZ16772.1 |
| <i>Thermosynechococcus elongates</i> | Chi | WP_011056062.1 |
| <i>Lyngbya sp.</i> | Chi | WP_009787675.1 |
| <i>Nodularia spumigena</i> | Chi | WP_006196313.1 |
| <i>Capsicum annuum</i> | Zeta | AAN39918.1 |
| <i>Malva pusilla</i> | Zeta | AAO61856.1 |
| <i>Dianthus caryophyllus</i> | Zeta | P28342.1 |
| <i>Euphorbia esula</i> | Zeta | P57108.1 |

```

GSTA5_Ancoa      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTB5_Caeel     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTA4_Chick     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTM2_Mouse     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTM3_Homo      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTM1_Deapt     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTP1_Homo      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTP1_Caphi     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC1_Cyprinus  . . . . . 1 5 10 20 30
GSTA_Hypophthalmichthys . . . . . 1 5 10 20 30
GSTB_Danio      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Euphocbia . . . . . 1 5 10 20 30
GSTP1_Dianthus . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Anopheles . . . . . 1 5 10 20 30
GSTD_Qeligo     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTD_Drosophila . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Drosophila . . . . . 1 5 10 20 30
GSTT1_Homo      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTT1_Macaca    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTT1_Bovini    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Capsicum   . . . . . 1 5 10 20 30
GSTP1_Solanum  . . . . . 1 5 10 20 30
GSTP1_Sea       . . . . . 1 5 10 20 30
GSTX_Lyngbya    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Modularia  . . . . . 1 5 10 20 30
GSTX_Thermose   . . . . . 1 5 10 20 30
GSTC_Medicago   . . . . . 1 5 10 20 30
GSTL_Arabidopsis . . . . . 1 5 10 20 30
GSTL_Rheum      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTO1_Homo      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTO2_Mouse     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTO1_OrisiI    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTU6_OrisiJ    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTK1_Rattus    . . . . . 1 5 10 20 30
GSTK1_Mouse     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTL_Homo      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTS_Osmal      . . . . . 1 5 10 20 30
GSTL0_Algae     . . . . . 1 5 10 20 30
GSTB_Mannheimia . . . . . 1 5 10 20 30
GSTB_Providencia . . . . . 1 5 10 20 30

```

```

GSTA5_Ancoa      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTB5_Caeel     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTA4_Chick     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTM2_Mouse     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTM3_Homo      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTM1_Deapt     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTP1_Homo      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTP1_Caphi     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC1_Cyprinus  . . . . . 40 50 60 70 80
GSTA_Hypophthalmichthys . . . . . 40 50 60 70 80
GSTB_Danio      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Euphocbia . . . . . 40 50 60 70 80
GSTP1_Dianthus . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Anopheles . . . . . 40 50 60 70 80
GSTD_Qeligo     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTD_Drosophila . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Drosophila . . . . . 40 50 60 70 80
GSTT1_Homo      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTT1_Macaca    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTT1_Bovini    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Capsicum   . . . . . 40 50 60 70 80
GSTP1_Solanum  . . . . . 40 50 60 70 80
GSTP1_Sea       . . . . . 40 50 60 70 80
GSTX_Lyngbya    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Modularia  . . . . . 40 50 60 70 80
GSTX_Thermose   . . . . . 40 50 60 70 80
GSTC_Medicago   . . . . . 40 50 60 70 80
GSTL_Arabidopsis . . . . . 40 50 60 70 80
GSTL_Rheum      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTO1_Homo      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTO2_Mouse     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTO1_OrisiI    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTU6_OrisiJ    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTK1_Rattus    . . . . . 40 50 60 70 80
GSTK1_Mouse     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTL_Homo      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTS_Osmal      . . . . . 40 50 60 70 80
GSTL0_Algae     . . . . . 40 50 60 70 80
GSTB_Mannheimia . . . . . 40 50 60 70 80
GSTB_Providencia . . . . . 40 50 60 70 80

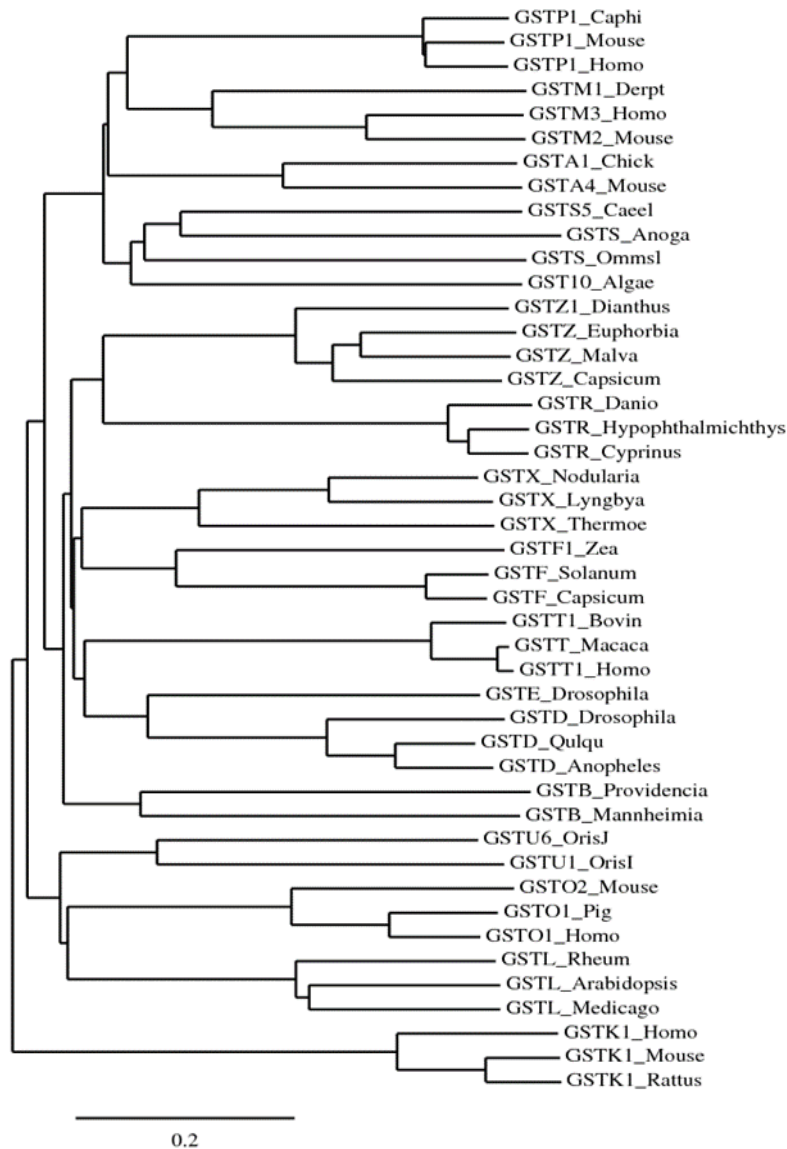
```

```

GSTA5_Ancoa      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTB5_Caeel     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTA4_Chick     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTM2_Mouse     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTM3_Homo      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTM1_Deapt     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTP1_Homo      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTP1_Caphi     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC1_Cyprinus  . . . . . 90 100 110 120 130
GSTA_Hypophthalmichthys . . . . . 90 100 110 120 130
GSTB_Danio      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Euphocbia . . . . . 90 100 110 120 130
GSTP1_Dianthus . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Anopheles . . . . . 90 100 110 120 130
GSTD_Qeligo     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTD_Drosophila . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Drosophila . . . . . 90 100 110 120 130
GSTT1_Homo      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTT1_Macaca    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTT1_Bovini    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Capsicum   . . . . . 90 100 110 120 130
GSTP1_Solanum  . . . . . 90 100 110 120 130
GSTP1_Sea       . . . . . 90 100 110 120 130
GSTX_Lyngbya    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Modularia  . . . . . 90 100 110 120 130
GSTX_Thermose   . . . . . 90 100 110 120 130
GSTC_Medicago   . . . . . 90 100 110 120 130
GSTL_Arabidopsis . . . . . 90 100 110 120 130
GSTL_Rheum      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTO1_Homo      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTO2_Mouse     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTO1_OrisiI    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTU6_OrisiJ    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTK1_Rattus    . . . . . 90 100 110 120 130
GSTK1_Mouse     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTL_Homo      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTS_Osmal      . . . . . 90 100 110 120 130
GSTL0_Algae     . . . . . 90 100 110 120 130
GSTB_Mannheimia . . . . . 90 100 110 120 130
GSTB_Providencia . . . . . 90 100 110 120 130

```

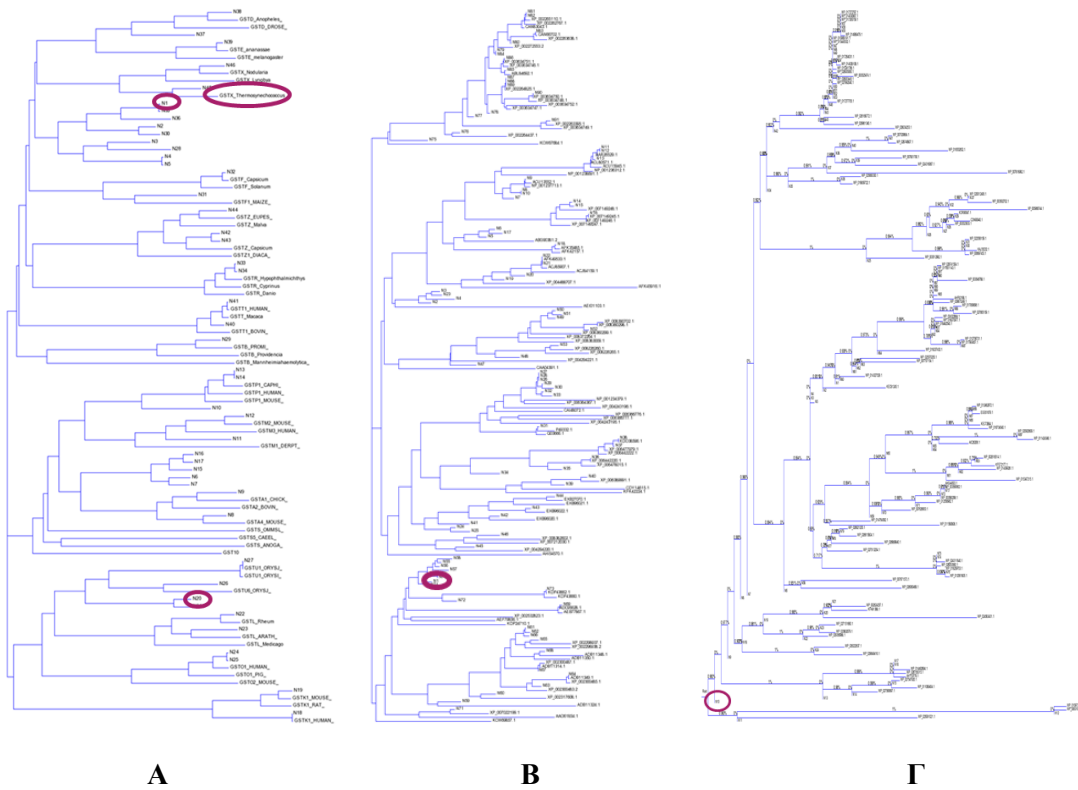
Εικόνα 3.4: Αμινοξική αλληλούχηση ενζύμων GSTs από διάφορους οργανισμούς χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 1994).



Εικόνα 3.5: Φυλογενετική ανάλυση των ισοενζύμων GST. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με τη βοήθεια βιοϋπολογιστικών εργαλείων διαθέσιμα από το Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>). Προέκυψε κατόπιν αμινοξικής στοίχισης ενζύμων GSTs από διάφορους οργανισμούς χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW (ClustalW, Thompson et al., 1994). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο οργανισμός προέλευσης είναι: GSTA4_Mouse (*Mus musculus*, NP_034487.2), GSTA1_Chick (*Gallus gallus*, NP_001001777.1), GSTB_Mannheimia (*Mannheimia haemolytica*, WP_006248215.1), GSTB_Providencia (*Providencia rettgeri*, WP_004263858.1), GSTD_Anopheles (*Anopheles cracens*, 1JLV_A), GSTD_Qulqu (*Culex quinquefasciatus*, XP_001844244.1), GSTD_Drosophila (*Drosophila sechellia*, XP_002031492.1), GSTE_Drosophila (*Drosophila melanogaster*, NP_611323.1), GSTF_Capsicum (*Capsicum chinense*, CAI51314.2), GSTF_Solanum (*Solanum commersonii*, ABQ96852.1), GSTF1_Zea (*Zea mays*, NP_001105412.1), GSTK1_Rattus (*Rattus norvegicus*, NP_852036.1), GSTK1_Mouse (*Mus musculus*, NP_083831.1), GSTK1_Homo (*Homo sapiens*, NP_057001.1), GSTL_Medicago (*Medicago truncatula*, ACJ84312.1), GSTL_Rheum (*Rheum australe*, ACH63212.1), GSTL_Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, NP_195899.1), GSTM2_Mouse (*Mus musculus*, EDL01935.1), GSTM3_Homo (*Homo sapiens*, NP_000840.2), GSTM1_Derpt (*Dermatophagoides pteronyssinus*, AAX37326.1), GSTO1_Homo (*Homo sapiens*, NP_004823.1),

GSTO2_Mouse (*Mus musculus*, NP_080895.2), GSTO1_Pig (*Sus scrofa*, NP_999215.1), GSTP1_Homo (*Homo sapiens*, NP_000843.1), GSTP1_Mouse (*Mus musculus*, NP_038569.1), GSTP1_Caphi (*Capra hircus*, AAF01323.1), GSTR_Cyprinus (*Cyprinus carpio*, ABD67511.1), GSTR_Hypophthalmichthys (*Hypophthalmichthys molitrix*, ABV24478.1), GSTR_Danio (*Danio rerio*, NP_001038525.1), GSTS_Ommsl (*Nototodarus sloanii*, P46088.1), GSTS_Anoga (*Anopheles gambiae*, XP_311546.4), GSTS5_Caeel (*Caenorhabditis elegans*, NP_001254267.1), GSTT1_Homo (*Homo sapiens*, NP_000844.2), GSTT1_Bovin (*Bos taurus*, NP_001039697.1), GSTT_Macaca (*Macaca mulatta*, XP_001089367.1), GSTU1_OrisI (*Oryza sativa* Indica Group, A2XMN2.1), GSTU6_OrisJ (*Oryza sativa* Japonica Group, EAZ16772.1), GSTX_Thermoe (*Thermosynechococcus elongatus*, WP_011056062.1), GSTX_Lyngbya (*Lyngbya* sp., WP_009787675.1), GSTX_Nodularia (*Nodularia spumigena*, WP_006196313.1), GSTZ_Capsicum (*Capsicum annum*, AAN39918.1), GSTZ_Malva (*Malva pusilla*, AAO61856.1), GSTZ1_Dianthus (*Dianthus caryophyllus*, P28342.1), GSTZ_Euphorbia (*Euphorbia esula*, P57108.1).

Με την βοήθεια του βιοϋπολογιστικού εργαλείου FastML, προβλέφθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις και οι αρχέγονες αλληλουχίες και παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.6). Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τρία διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα. Στην Εικόνα 3.6Α, παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο από όπου προέκυψαν οι αλληλουχίες N1 Ancient, *ThermoGST* και N20 Ancient. Η αλληλουχία N1 Ταυ προέκυψε από το φυλογενετικό δέντρο των αρχέγονων μορφών της *tau* τάξης (Εικόνα 3.6Β) και η αλληλουχία N10 *AtuGST* προβλέφθηκε από το φυλογενετικό δέντρο αρχέγονων βακτηριακών GSTs (Εικόνα 3.6Γ).



Εικόνα 3.6: Φυλογενετικές σχέσεις και αρχέγονες αλληλουχίες που προβλέφθηκαν με τη βοήθεια του βιοϋπολογιστικού εργαλείου FastML.

Η αμινοξική και η νουκλεοτιδική ακολουθία του κάθε συνθετικού ενζύμου φαίνεται παρακάτω.

> N1 Ancient

```
MHHHHHHKLYGAARSPPCSRVRIALEEKLGIDYEFKLVLDLQEAPDYDKGEHLSPEFLKLNPLGKVPVLVDDGDIVLWE
SRAILLYLAEKYGESDTGLPQLLPKDPEEAQKRAIVYQWVFFANSTLQPLQNLAFYSYLFAMFAAATRDPKPKIKAAAL
EALEKVLKEREDKFLQNKYLAGDGGDFSLADLALVPLVLSYLPAMRFDGGKPYVDLSQYPHLAAWYERVQERPAFQK
VLEAER
```

```
ATGCATCATCATCACCACAAACTGTATGGTGCAGCACGTAGCCCTCCGTGTAGCCGTGTTCTGATTGCACTGGAA
GAAAAACTGGGTCTGGATTATGAATTCAAACTGGTGGATCTGCAAGAGGCACCGGATTATGATAAAGGTGAACATCT
GAGTCCGGAATTCTGAAACTGAATCCGCTGGGTAAAGTTCGGTTCGTTGATGATGGTGATATTGTTCTGTGGG
AAAGCCGTGCAATTCTGCTGTATCTGGCAGAAAAATATGGTGAAAGCGATACCGGCTGCCGCAGCTGCTGCCGAA
AGATCCGGAAGAAGCACAGAAACGCGCAATTGTTTATCAGTGGGTTTTTTTTGCAAATAGCACCTGCAGCCGCTG
CAGAACTGGCATTATATAGCTACCTGTTTGAATGTTTGCAGCAGCAACCCGTGATCCGGAAGCACCGAAAAAAT
CAAAGCAGCACTGGAAGCCCTGAAAAAGTTCTGAAAGAACGCGAAGATAAATTCCTGCAGAACCAGAAATATCT
GGCTGGTGATGGTGGTGAATTTAGCCTGGCAGATCTGGCACTGGTTCGGTGCTGAGCTATCTGCCTGCAATGCGTT
TTGATGGTGGTAAACCGTATGTTGATCTGAGCCAGTATCCGCATCTGGCAGCATGGTATGAACGTGTTCAAGAACGT
CCGGCATTTCAGAAAGTCTGGAAGCAGAACGTAA
```

> N20 Ancient

MHHHHHHSGESLRPLGKGSAPPGMASEGTLRLYSFWSCPFAQRVRLVLNYKGLQYEYKLVLDINEAPDYDLGNKPDWFF
KKNPPFGKVPVLEHSQGRLLISESLVIVQYLDEAYPGGAGGLPSLLPDDPDAAYERAVAKMWLDYVDDKLHPLLSALLRG
SNKGEERAAATEELAKEFDKLEALGEKENGKPEDKFLKKQFFGGGGGRLSLVDVALVPFLEWFQAIELDVGKRFDV
VDHTPKLAAWMERLKKIPAVKALLTDDPEKLEFLESLLQKSPECKYGL

ATGCATCATCATCACCATAGCGGTGAAAGCCTGCGTCCGCTGGGTAAAGGTAGCGCACCCGCTGGTATGGCAAG
CGAAGGCACCCTGCGTCTGTATAGCTTTTGGAGCTGTCCGTTTGCACAGCGTTCGCTCGTTCTGAACTATAAAG
GTCTGCAGTATGAGTATAAACTGGTGGATATTAATGAGGCACCGATTATGATCTGGGTAATAAACCGGATTGGTTTT
TCAAAAAAACCCCTCCGTTTGGTAAAGTCCGGTCTGGAACATAGCCAGGGTCTGATTAGCGAAAGCCTGGT
TATTGTTCAAGTATCTGGATGAAGCATATCCGGTGGTGCCGGTGGTCTGCCGAGCCTGCTGCCGATGATCCGGATG
CAGCATATGAACGTGCAGTTGCAAAAATGTGGCTGGATTATGTTGATGATAAACTGCATCCGCTGCTGAGCGCACTG
CTGCGTGGTAGCAATAAAGGTGAAGAACGTGCAGCAGCAACCGAAGAAGTGGCAAAAAGATTGATAAACTGGAA
GAAGCACTGGGCGAAAAAGAAAATGGTAAACCGGAAGATAAATTTCTGAAAAACAGTCTTTGGTGGTGGCGGT
GGTGGTCTGCTGAGCCTGGTTGATGTTGCACTGGTCCGTTTCTGGAATGGTTTCAGGCAATTGAACTGGATGTTGG
TAAACGTTTTGATGTTGATCATACCCGAAACTGGCAGCATGGATGGAACGCTGAAAAAATCCCTGCAGTTA
AAGCACTGCTGACCGATGATCCTGAAAACTGCTGGAATTTCTGAAAAGCCTGCTGCAGAAAAGTCCGGAAAAAT
GTAATAATGCCTGTAA

> N10 *Atu*GST

MHHHHHHTPTITAFERSPDRGRGLARDMRVRWALEEVGQPYDVRLVSFKAMKEPAHLALHPPGQIPTYEEDLALFES
GAIVLHIAERHAGLLPDDANARARAITWMFAALNTVEPPIVELAMARL FERDESWYEQRLPMVEDRIRKRLGELSARL
GDADWLDGAFSAGDLMVMVSVLRRLKSSGRILDEYPNLSAYVARGEARPAFKRAFDAQLVFTAASS

ATGCATCATCATCACCATACCCGACCATTACCGCATTGAACGTAGTCCGGATCGTGGTCTGGTCTGGCACGT
GATATGCGTGTTCGTTGGGCACCTGGAAGAGGTTGGTCAGCCGATGATGTTCTGCTCGTTAAAGCAATGAA
AGAACCAGGCACATCTGGCACTGCATCCGTTTGGTTCAGATTCCGACCTATGAAGAAGGTGATCTGGCACTGTTGAA
AGCGGTGCAATTGTTCTGCATATTGCCGAACGTCATGCAGGCTGCTGCCGATGATGCAAAATGCACGTGCCCGTGC
AATTACCTGGATGTTTGCAGCACTGAATACCGTTGAACCGCTATTGTTGAACTGGCAATGGCAGCTCTGTTGAA
GTGATGAAAGCTGGATGAACAGCGTCTGCCGATGGTTGAAGATCGTATTCTGAAACGCTGGGTGAACTGAGCGC
ACCGCTGGGTGATGAGATTGGCTGGATGGTGCATTAAGTCCGGTATCTGATGATGGTTAGCGTTCTGCCGCTGC
TGAAAAGCAGCGTCTGATTCTGGATGAATATCCGAATCTGAGCGCATATGTTGCACGTGGTGAAGCAGTCCGGCA
TTTAAACGTGCATTGATGCACAGCTGGCAGTTTTTACCGCAGCAAGCAGCTAA

> *Thermo*GST

MHHHHHHLKLYGGAKSRASIVRWYLEELGIPYEFVLIDLQAGEQHQPFLKLNPMGKVPVIVDGDVVLWESGAILLYL
AQVHGELPKDAAAAAQVYQWVLFANSTLTQAMFPAETRDRQLPPLLKGIETALMGQSYILGKDFSVADVALGSMLAYL
QMLFQVDLSPYPAVDYVARLQQRPAFQKGLMGARA

ATGCATCATCATCACCATACCTGAAACTGTATGGTGGTGCAAAAAGCCGTGCAAGCATTGTTCTGTTGGTATCTGGA
AGAACTGGGTATCCCGTATGAATTTGTTCTGATTGATCTGCAGGCAGGCGAACAGCATCAGCCGGAATTTCTGAAAC
TGAATCCGATGGGTAAAGTTCGGTTATTGTTGATGGTATGTTGTTCTGTGGGAAAGCGGTGCAATCTGCTGTATC
TGGCAGAGTTTATGGTGAAGTGCAGGAAAGATGCAGCAGCAGCAGCCAGGTTTATCAGTGGGTTCTGTTTCAAAA
TAGCACCTGACCCAGGCAATGTTTCCGGCAGAAACCCGTGATCGTCAGCTGCCTCCGCTGCTGAAAAGGATTGAA
ACCGCACTGATGGGTGAGAGCTATATTCTGGGTAAAGATTTAGCGTTGAGATGTTGCACTGGGTAGCATGCTGGC
ATATCTGCAGATGCTGTTTCAAGTTGATCTGAGCCCGTATCCGGCAGTTGCAGATTATGTTGCACGCTGCAGCAGCG
TCCGGCATTTCAGAAAGGTCTGATGGGTGCACGTGCATAA

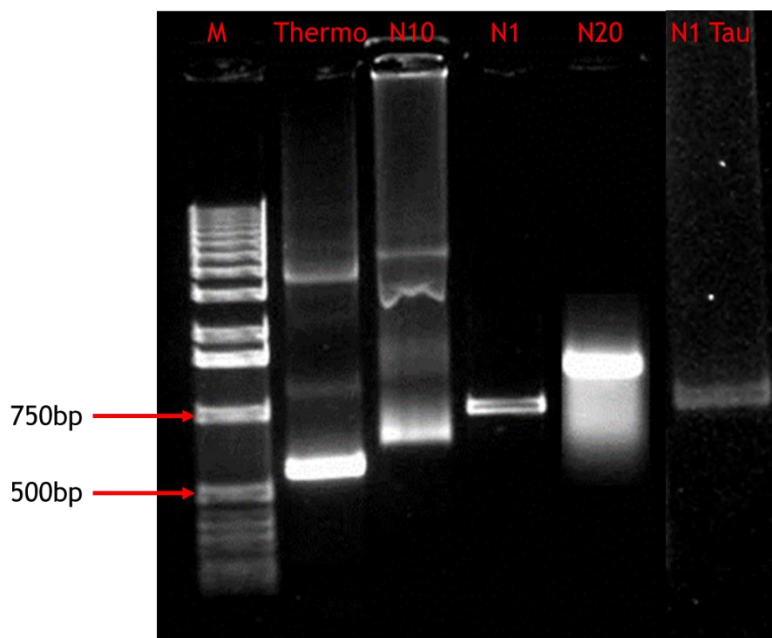
> N1 Tau

```
MHHHHHHHADEVILLDFWSPFGMRVRIALAEKGIKYEYKEEDGLLRNKSPLLLQMNVPVHKIPVLIHNGKPVCESLIAV
QYIDEVWKDKSPPLLPSDPYQRAQARFWADYVDKKIYDLGRRKIWTTKGEEQEAAKKEFIECLKLLEGELGDKPYFGG
ESFGFVDVALVPFYSWFSWFYAYETCGNFSIEAECPKLIAWAKRCLQKESVSKSLPDQEKVYGFVLELKKKFGIEYVGA

ATGCATCATCATCATCACCATGCCGATGAAGTTATTCTGCTGGATTTTGGCCGAGCCCCTTGGTATGCGTGTTCGTA
TTGCACTGGCAGAAAAAGGCATCAAATATGAATACAAAGAAGAGGACGGTCTGCTGCGTAATAAAAGTCCGCTGCT
GCTGCAGATGAATCCGGTTCACAAAAAATCCCGGTGCTGATTCATAATGGTAAACCGTTTGTGAAAGCCTGATTG
CCGTTTCAGTATATTGATGAAGTGTGGAAAGATAAAAGCCCTCCGCTGCTGCCGAGCGATCCGATCAGCGTGCACAG
GCACGTTTTTGGGCAGATTATGTTGACAAAAAATCTATGATCTGGGTCGTCGAAAATCTGGACCACCAAAGGTGA
AGAACAAGAAGCAGCCAAAAAAGAATTATTGAATGCCTGAAACTGCTGGAAGGTGAACTGGGTGATAAACCGTAT
TTTGGTGGTGAAGCTTTGGTTTTGTTGATGTTGCACTGGTCCGTTTTATAGCTGGTTCAGCTGGTTTTATGCATATG
AAACCTGCGGCAACTTTAGCATTGAAGCAGAATGTCCGAAACTGATTGCATGGGCAAAACGTTGTCTGCAGAAAGA
AAGCGTAGCAAAAAGCCTGCCGATCAAGAAAAAGTTTTATGGTTTTGTGCTGGAAGTGAACAAAAAATTTGGCATC
GAATATGTGGGTGCCTAA
```

3.3.2 Ενίσχυση των αρχέγονων αλληλουχιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 3.2.5 και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.7.



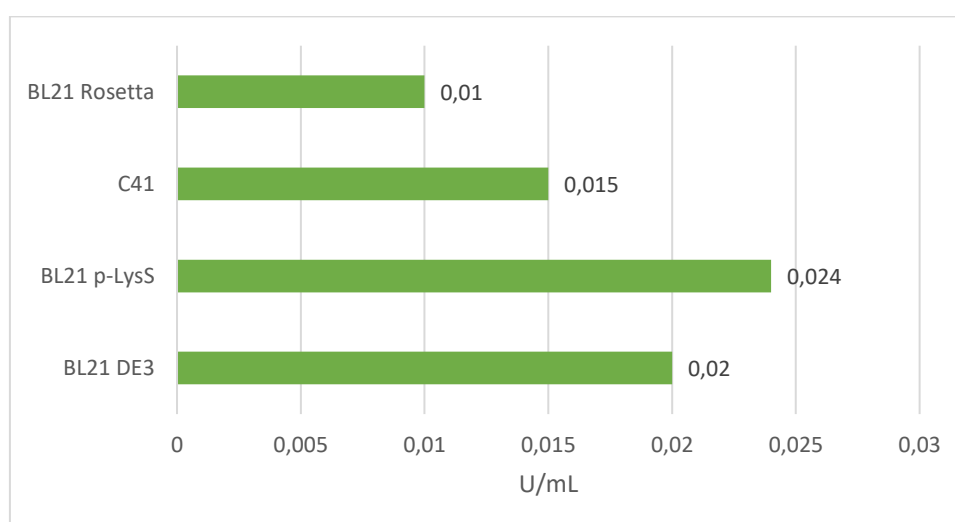
Εικόνα 3.7: Ενίσχυση των αρχέγονων γονιδίων με PCR. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA Ladder της Nippon Genetics.

Το γονίδιο της GST από τον οργανισμό *Thermosynechococcus elongatus* αποτελείται από 579 bp και πρόκειται για το μικρότερο γονίδιο σχετικά με τα υπόλοιπα συνθετικά αρχέγονα

γονίδια. Όσον αφορά στο N10 *AtuGST*, πρόκειται για ένα γονίδιο μεγέθους 669 bp. Σχετικά με το N1 Ancient και το N1 Tau, το μέγεθος τους δε διαφέρει σημαντικά αφού πρόκειται για δυο γονίδια με 726 bp και 711 bp αντίστοιχα. Τέλος, το μεγαλύτερο συνθετικό γονίδιο είναι το N20 Ancient και αποτελείται από 858 bp.

3.3.3 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* και ετερόλογος έκφραση των αρχέγονων ενζύμων

Αρχικά, μελετήθηκε η GST από τον οργανισμό *Thermosynechococcus elongatus*. Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών έκφρασης του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *E. coli*. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21p-LysS, *E. coli* (C41) και *E. coli* BL21 Rosetta, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης. Στο Διάγραμμα 3.1, φαίνονται τα αποτελέσματα.



Διάγραμμα 3.1: Ενζυμική δραστηριότητα (U/mL) της GST από το *Thermosynechococcus elongatus* με διαφορετικά στελέχη της *E. coli*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.1, επιλέχθηκε το στέλεχος *E. coli* BL21(p-LysS) για περαιτέρω μελέτη. Χρησιμοποιώντας το στέλεχος *E. coli* BL21(p-LysS) πραγματοποιήθηκε μελέτη διαφορετικών συνθηκών ώστε να επιλεγούν οι συνθήκες που δίνουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Έγιναν παραλλαγές του καθιερωμένου πρωτοκόλλου έκφρασης που αφορούσαν τόσο στην θερμοκρασία (37°C και 25°C) όσο και στη διάρκεια επώασης (4, 6, 8 h) μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια με διάρκεια επώασης 24 h σε θρεπτικό μέσο που περιείχε σαν επαγωγέα έκφρασης λακτόζη, χωρίς την προσθήκη IPTG. Για τα πειράματα

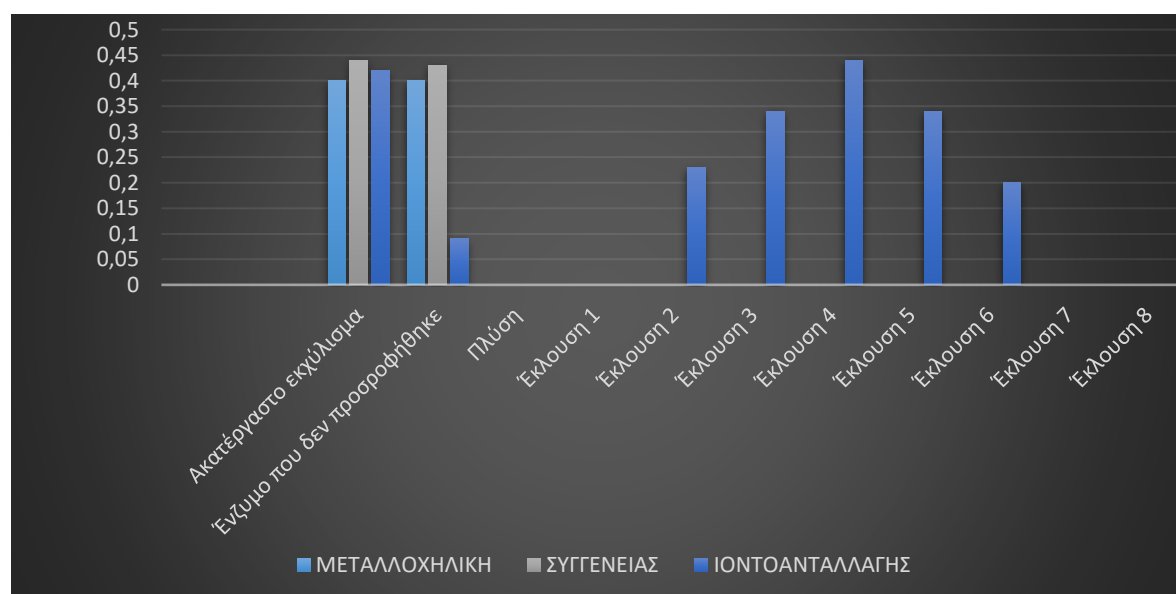
του συγκεκριμένου κεφαλαίου, επιλέχθηκε η έκφραση σε θρεπτικό μέσο που περιείχε λακτόζη λόγω της παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας (3-5 g).

Για τα υπόλοιπα αρχέγονα γονίδια N10 *AtuGST*, N20 *Ancient*, N1 *Ancient* και N1 *Tau* και δεδομένου ότι δεν φάνηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης χρησιμοποιώντας διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και 24 h έκφραση με θρεπτικό μέσο με λακτόζη.

3.3.4 Καθαρισμός των συνθετικών αρχέγονων ενζύμων

3.3.4.1 *ThermoGST* (*GST* από *Thermosynechococcus elongatus*)

Αρχικά, έγινε προσπάθεια καθαρισμού του ενζύμου μέσω μεταλλοχημικής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας συγγένειας, όπως περιγράφεται παραπάνω (§3.2.7). Ωστόσο, το συγκεκριμένο ένζυμο δεν προσροφήθηκε ικανοποιητικά από τους προσροφητές σε συνθήκες 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole pH 8 και 20 mM KH₂PO₄ pH 7. Πιο ειδικά, το ένζυμο δεν συγκρατήθηκε από τους προσροφητές, με αποτέλεσμα να απομακρυνθεί στο πρώτο στάδιο των καθαρισμών. Έτσι, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (§3.2.7.3). Πιο συγκεκριμένα, έγινε λύση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM pH 7, υπολογίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.8 και φορτώθηκε στην στήλη. Το ένζυμο εκλούστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (80 mM-120 mM). Τα αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου *ThermoGST* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.2.

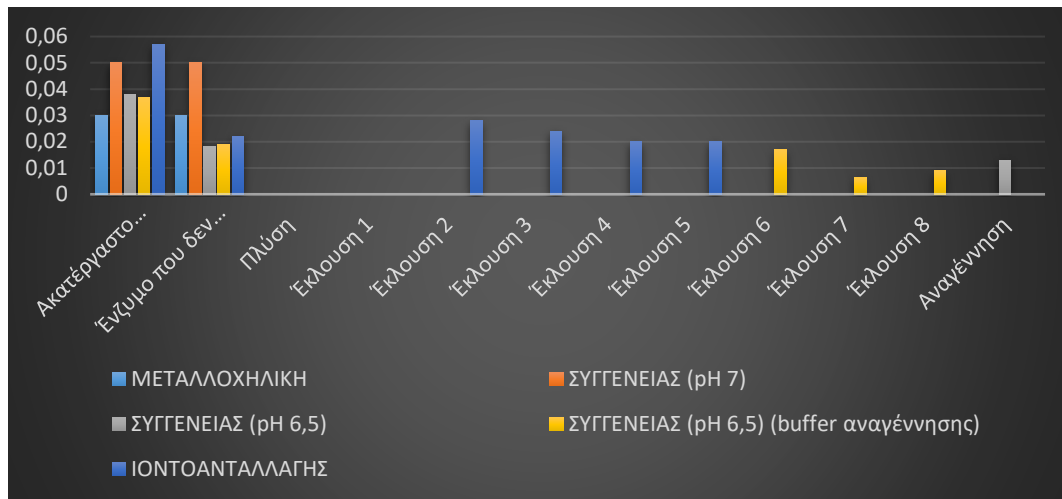


Διάγραμμα 3.2: Αποτελέσματα του καθαρισμού για το ένζυμο *ThermoGST*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν εμφανώς ότι το ένζυμο δεν προσροφάται από τους προσροφητές χρωματογραφίας συγγένειας ούτε μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας παρόλο που φέρει επίτοπο 6 ιστιδινών (6 His-tag). Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ωστόσο δίνει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα αφού το ένζυμο προσροφάται και εκλύεται με το διάλυμα έκλυσης. Η απόδοση του καθαρισμού ήταν περίπου 21 %, ενώ η καλύτερη έκλυση καθαρίστηκε 9 φορές. Η ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης με SDS έδειξε ότι επιτεύχθηκε μερικός καθαρισμός του ενζύμου.

3.3.4.2 N1 Ancient

Αρχικά, έγινε προσπάθεια καθαρισμού του ενζύμου μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας, λόγω του άκρου με τις 6 ιστιδίνες (6 His-tag) και χρωματογραφίας συγγένειας, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.7. Ωστόσο, το N1 Ancient δεν προσροφήθηκε από τους προσροφητές που χρησιμοποιήθηκαν, όπου παρατηρήθηκε απώλεια του ενζύμου τόσο στην εκροή μετά το φόρτωμα όσο και κατά το στάδιο της αναγέννησης της στήλης. Πραγματοποιήθηκαν επίσης παραλλαγές του καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,5, όπου παρατηρήθηκε καλύτερη προσρόφηση του ενζύμου χωρίς όμως να εκλουστεί με το διάλυμα εκλούσεων που περιείχε GSH. Έτσι, έγινε προσπάθεια καθαρισμού χρωματογραφίας συγγένειας με τις ίδιες συνθήκες με τη διαφορά ότι το διάλυμα εκλούσεων περιείχε GSH διαλυμένη στο διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αναγέννηση της στήλης και περιέχει NaCl. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (§3.2.7.3). Το ένζυμο εκλούστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (80 mM-110 mM). Τα αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου N1 Ancient παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.3.

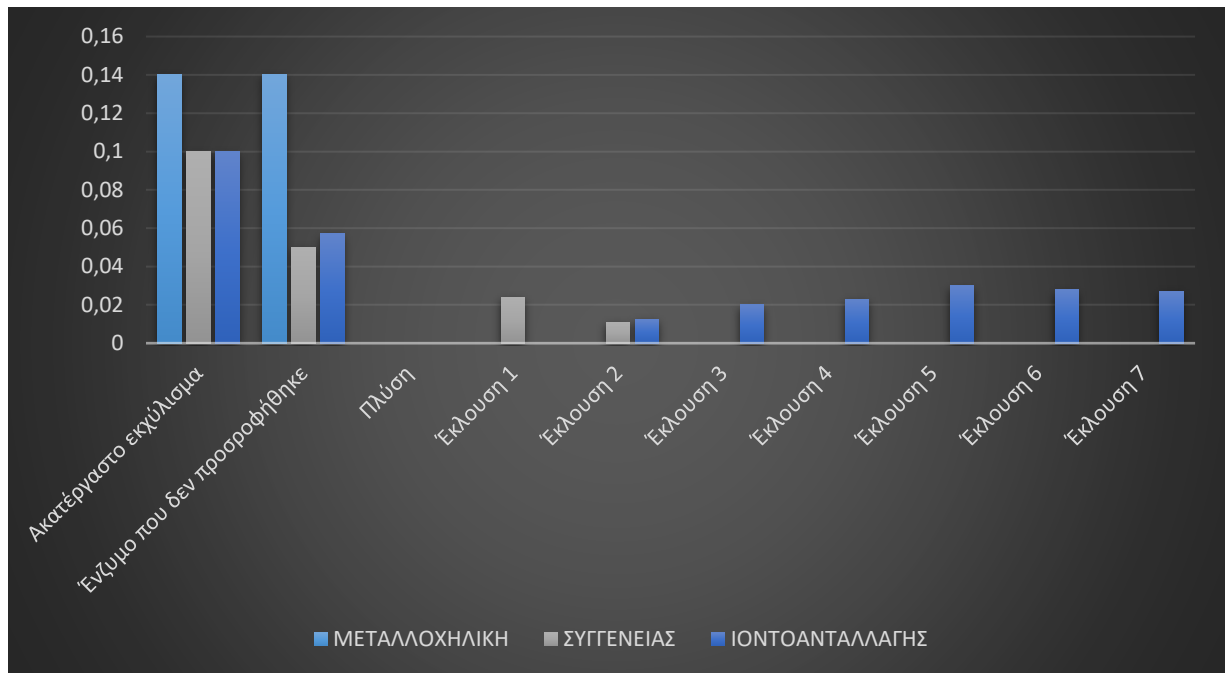


Διάγραμμα 3.3: Αποτελέσματα του καθαρισμού του N1 Ancient.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το N1 Ancient προσροφάται ικανοποιητικά από τον προσροφητή για χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και εκλύεται από το διάλυμα έκλουσης που περιέχει από 80-110 mM NaCl. Η απόδοση του καθαρισμού εκτιμάται στο 16 % και η καλύτερη έκλουση έχει καθαριστεί 3 φορές.

3.3.4.3 N10 *AtuGST*

Ο καθαρισμός του ενζύμου N10 *AtuGST*, αρχικά, έγινε μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας συγγένειας (§3.2.7). Ωστόσο, η προσρόφηση του ενζύμου δεν ήταν ικανοποιητική. Συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM pH 7, στην εκροή μετά το φόρτωμα της στήλης παρατηρήθηκε μερική απώλεια του ενζύμου, ενώ στην έκλουση 1 και 2 πραγματοποιήθηκε μερική έκλουση του ενζύμου. Κατά τη μεταλλοχηλική χρωματογραφία το ένζυμο δεν προσροφήθηκε καθόλου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε DEAE-Sepharose. Το ένζυμο εκλούστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (80 mM-130 mM). Τα αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου N10 *AtuGST* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.4.

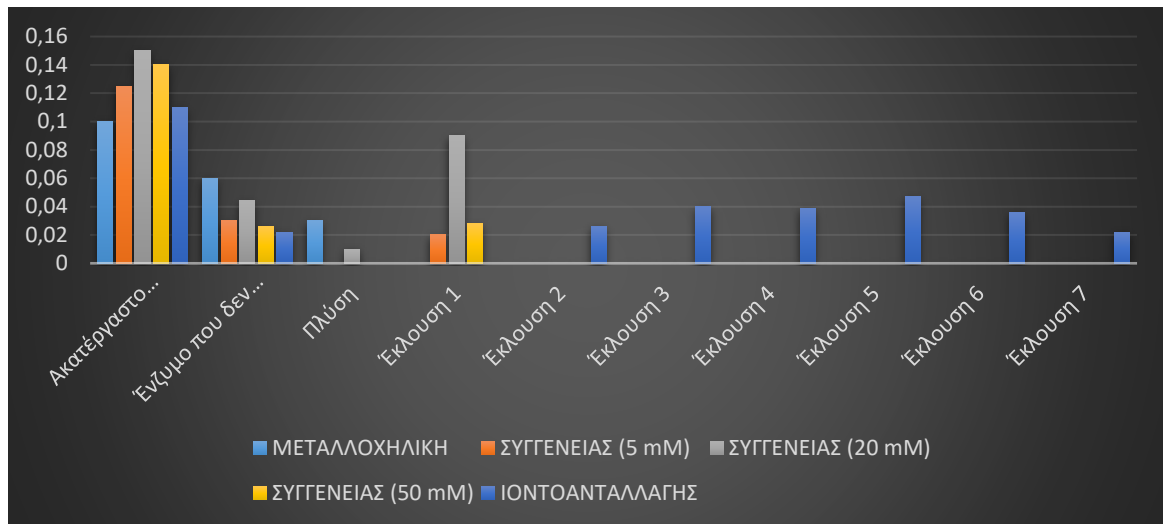


Διάγραμμα 3.4: Αποτελέσματα του καθαρισμού του N10 *AtuGST*.

Το ένζυμο N10 *AtuGST* καθαρίστηκε μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής με απόδοση 11 % και με την καλύτερη έκλουση να έχει καθαριστεί 7 φορές. Πρόκειται για μερικό καθαρισμό της πρωτεΐνης, χωρίς όμως να γίνεται εμπόδιο για την περαιτέρω μελέτη του ενζύμου.

3.3.4.4 N20 *Ancient*

Αρχικά, έγινε προσπάθεια καθαρισμού του ενζύμου μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας συγγένειας, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.7. Ωστόσο, το ένζυμο δεν προσροφήθηκε ικανοποιητικά από τους προσροφητές. Παραλλαγές της χρωματογραφίας συγγένειας εφαρμόστηκαν και αφορούσαν το στάδιο της εξισορρόπησης της στήλης. Συγκεκριμένα, για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών με διαφορετική ιοντική ισχύ (5 mM, 20 mM και 50 mM) pH 7. Στην εκροή μετά το φόρτωμα της στήλης καθώς και στο στάδιο απομάκρυνσης των αδέσμευτων μορίων παρατηρήθηκε μερική απώλεια του ενζύμου, ενώ στην πρώτη έκλουση εκλούσθηκε κάποια ποσότητα ενζύμου. Τέλος, έγινε καθαρισμός σε στήλη ιοντοανταλλαγής με DEAE-Sepharose. Το ένζυμο εκλούσθηκε σε διάλυμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (90 mM-140 mM). Τα αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου N20 *Ancient* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.5.

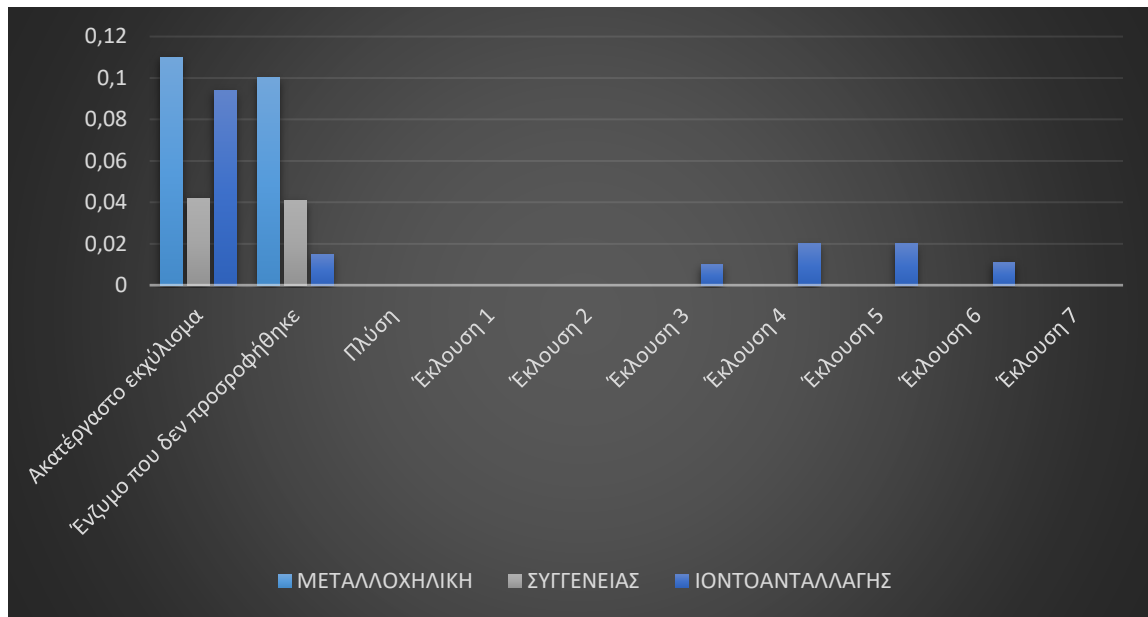


Διάγραμμα 3.5: Αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου N20 Ancient.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω αποτελέσματα, το ένζυμο N20 Ancient καθαρίστηκε μερικώς με απόδοση 14 %, ενώ η καλύτερη έκλυση καθαρίστηκε 9 φορές.

3.3.4.5 N1 Tau

Το ένζυμο N1 Tau καθαρίστηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.7.3. Ωστόσο, πριν επιλεγεί ο συγκεκριμένος τρόπος καθαρισμού, έγινε προσπάθεια να καθαριστεί μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας και μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, χωρίς όμως το ένζυμο να προσροφηθεί. Σχετικά με την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, επιλέχθηκε θετικά φορτισμένος ιοντοανταλλάκτης (pH 7) (DEAE-Sepharose). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM pH 7 και αφού υπολογίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα, φορτώθηκε στη στήλη. Οι εκλούσεις περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (70 mM-130 mM). Τα αποτελέσματα των καθαρισμών παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3.6).



Διάγραμμα 3.6: Αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου N1 Tau.

Η απόδοση του καθαρισμού του N1 Tau ήταν 21 % και η καλύτερη έκλουση καθαρίστηκε 8 φορές.

Όλα τα συνθετικά αρχέγονα γονίδια παρόλο που έφεραν στο άκρο τους τις 6 ιστιδίνες (6 His-tag) για πιο εύκολο καθαρισμό μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας, καθαρίστηκαν μερικώς μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Στον Πίνακα 3.4, φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των καθαρισμών και για τα πέντε ένζυμα.

Πίνακας 3.4: Καθαρισμός σε στήλη ιοντοανταλλαγής με DEAE-Sepharose.

| ENZYMΟ | | U/mL | mg/mL | SA (U/mg) | ΑΠΟΔΟΣΗ (%) | ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ (ΦΟΡΕΣ) |
|-------------------|---------------------|-------|-------|-----------|-------------|--------------------|
| ThermoGST | Βιολογικό εκχύλισμα | 0,42 | 22,7 | 0,0185 | 21 | 9 |
| | Έκλουση | 0,44 | 2,6 | 0,169 | | |
| N1 Ancient | Βιολογικό εκχύλισμα | 0,057 | 19,2 | 0,003 | 16 | 3 |
| | Έκλουση | 0,028 | 3,3 | 0,008 | | |
| N10 AtuGST | Βιολογικό εκχύλισμα | 0,1 | 27,8 | 0,0036 | 11 | 7 |
| | Έκλουση | 0,03 | 1,2 | 0,025 | | |

| | | | | | | |
|------------------------|------------------------|-------|------|--------|----|---|
| N20 Ancient | Βιολογικό εκχύλισμα | 0,11 | 29,2 | 0,0038 | 14 | 9 |
| | Έκλουση | 0,047 | 1,38 | 0,034 | | |
| N1 TAU | Βιολογικό εκχύλισμα | 0,094 | 31,5 | 0,003 | 21 | 8 |
| | Έκλουση | 0,02 | 0,87 | 0,023 | | |

3.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας των αρχέγονων ενζύμων ως προς πιθανά υποστρώματα

Τα αρχέγονα συνθετικά ένζυμα υποβλήθηκαν σε φωτομετρικές δοκιμές ενζυμικής δραστηριότητας με διάφορες ενώσεις οι οποίες έχουν δείξει ότι λειτουργούν ως υποστρώματα σε διαφορετικά ισοένζυμα GST, προκειμένου να ελεγχθεί η καταλυτική τους ποικιλότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5 συγκεντρωτικά και για τις πέντε αρχέγονες μορφές. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν φαίνεται τα αρχέγονα ένζυμα να εμφανίζουν σημαντική καταλυτική ποικιλότητα. Συγκεκριμένα, αναφορικά με τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις το BDNB φαίνεται ως αποδεκτό υπόστρωμα και από τα πέντε ένζυμα. Το FDNB δεν λειτουργεί ως υπόστρωμα για κανένα από τα μελετώμενα ένζυμα, ενώ το N1 Ancient, το *ThermoGST* και το N1 Tau φαίνεται να έχουν πολύ χαμηλή δραστηριότητα με το CDNB. Δυο από τα πέντε ένζυμα (το N1 Ancient και το *ThermoGST*) εμφανίζουν μια πολύ χαμηλή ειδική δραστηριότητα με το IDNB. Όσον αφορά στο PNBC, το N10 *AtuGST*, το *ThermoGST* και το N1 Tau παρουσιάζουν μια πολύ καλή ειδική δραστηριότητα, αρκετά καλύτερη από τη δραστηριότητα ως προς το BDNB. Τέλος, το NBD-Cl φαίνεται να λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα N1 Ancient, N20 Ancient, *ThermoGST* και N1 Tau.

Το N1 Ancient είναι το μοναδικό από τα αρχέγονα ένζυμα το οποίο καταλύει τη μετατροπή του Fluorodifen σε 4-νιτροφαινόλη. Όσο για το EA και την trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, το *ThermoGST* καταλύει τον σχηματισμό συμπλόκου τους με την γλουταθειόνη. Η HNE καθώς και η HED αποτελούν αποδεκτά υποστρώματα για τα τέσσερα από τα πέντε ένζυμα, συγκεκριμένα για το N1 Ancient, το N10 *AtuGST*, το N20 Ancient και το N1 Tau.

Επίσης, τα πέντε συνθετικά ένζυμα μελετήθηκαν ως προς την δράση υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας το CuOOH, το tert-BuOOH και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε γενικές γραμμές αυτά τα υποστρώματα δεν χρησιμοποιούνται από κανένα από τα πέντε ένζυμα, με εξαίρεση το N1 Ancient το οποίο

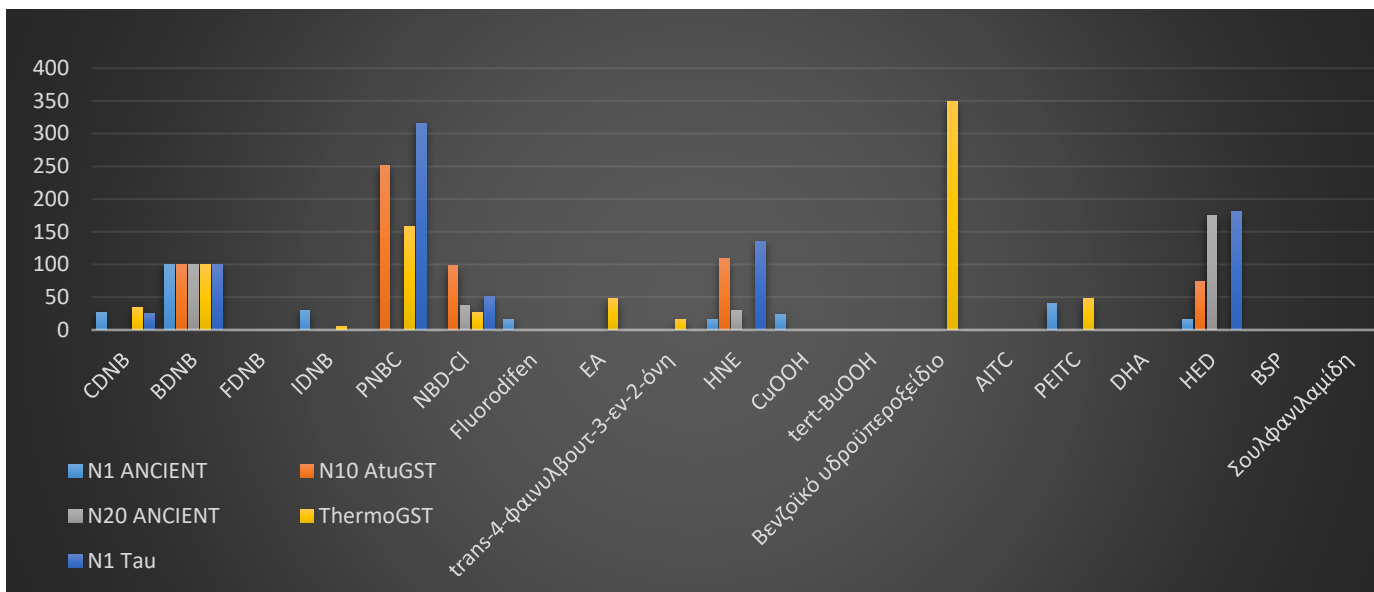
εμφάνισε μια μικρή δραστικότητα με το CuOOH και το *ThermoGST* που εμφάνισε εξαιρετικά μεγάλη δραστικότητα με το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο .

Το AITC, το DHA, το BSP και η σουλφανιλαμίδη δεν αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για κανένα από τα πέντε αρχέγονα ένζυμα. Τέλος, το PEITC λειτουργεί ως υπόστρωμα για το N1 Ancient και το *ThermoGST*.

Πίνακας 3.5: Ειδική δραστικότητα (%) των αρχέγονων ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα. Ως 100 % ορίζεται η ειδική δραστικότητα ως προς BDNB.

| Υπόστρωμα | N1 ANCIENT (%) | N10 <i>AtuGST</i> (%) | N20 ANCIENT (%) | <i>ThermoGST</i> (%) | N1 Tau (%) |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------|----------------------|------------|
| BDNB | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CDNB | 26,7 | M.A. | M.A. | 34,9 | 25,8 |
| FDNB | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| IDNB | 30 | M.A. | M.A. | 5,9 | M.A |
| PNBC | M.A. | 252 | M.A. | 158,7 | 316,1 |
| NBD-Cl | M.A. | 97,8 | 37,5 | 26,9 | 51,6 |
| Fluorodifen | 16,7 | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| EA | M.A. | M.A. | M.A. | 47,6 | M.A |
| trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη | M.A. | M.A. | M.A. | 15,8 | M.A |
| HNE | 16,7 | 108,7 | 29,5 | M.A. | 135,4 |
| CuOOH | 23,3 | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| tert-BuOOH | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| Βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο | M.A. | M.A. | M.A. | 349 | M.A |
| AITC | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| PEITC | 40 | M.A. | M.A. | 47,6 | M.A |
| DHA | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| HED | 16,7 | 73,9 | 175 | M.A. | 180,6 |
| BSP | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |
| Σουλφανιλαμίδη | M.A. | M.A. | M.A. | M.A. | M.A |

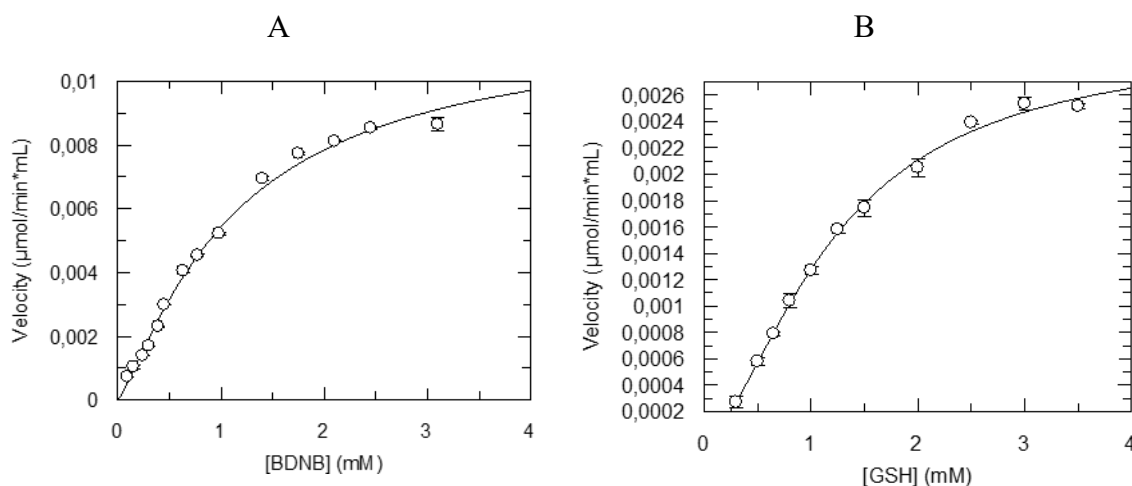
*M.A.: Μη Ανιχνεύσιμο



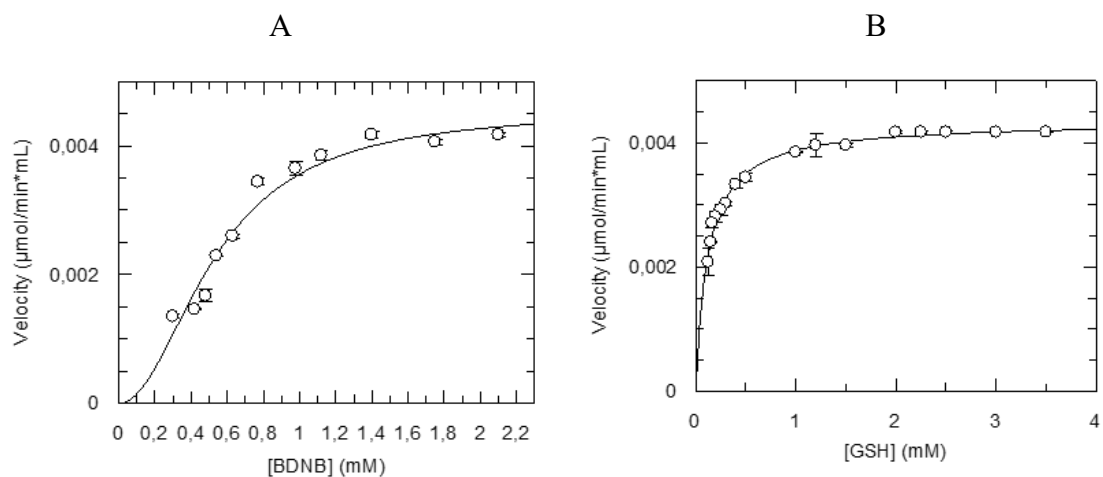
Διάγραμμα 3.7: Ειδική δραστηριότητα (%) των αρχέγονων ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα.

3.3.6 Κινητική ανάλυση των αρχέγονων ενζύμων ως προς τα υποστρώματα BDNB και GSH

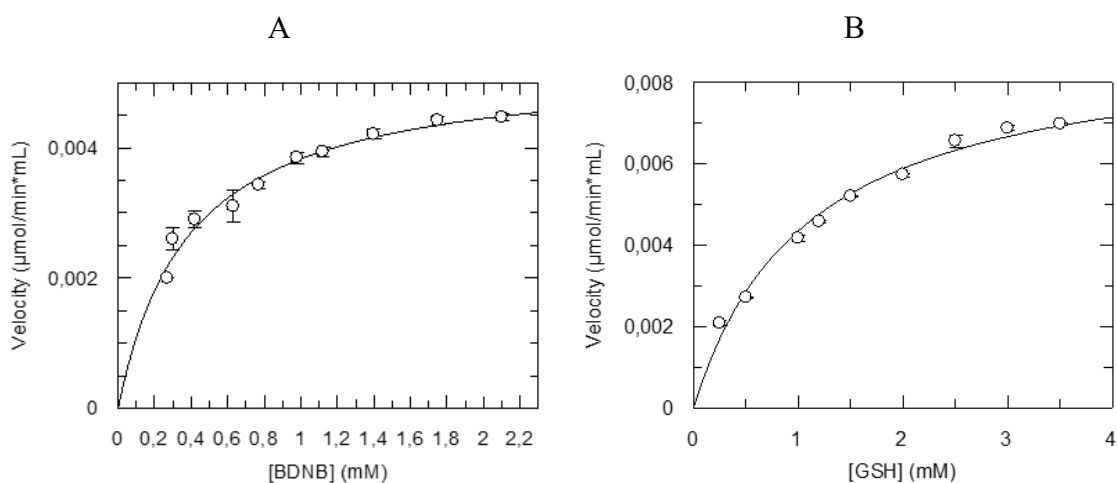
Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των πέντε συνθετικών ενζύμων για τα υποστρώματα BDNB και GSH και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι K_m και k_{cat} (Πίνακας 3.6). Οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται αναλυτικά για το κάθε ένζυμο στην Παράγραφο 3.2.9.



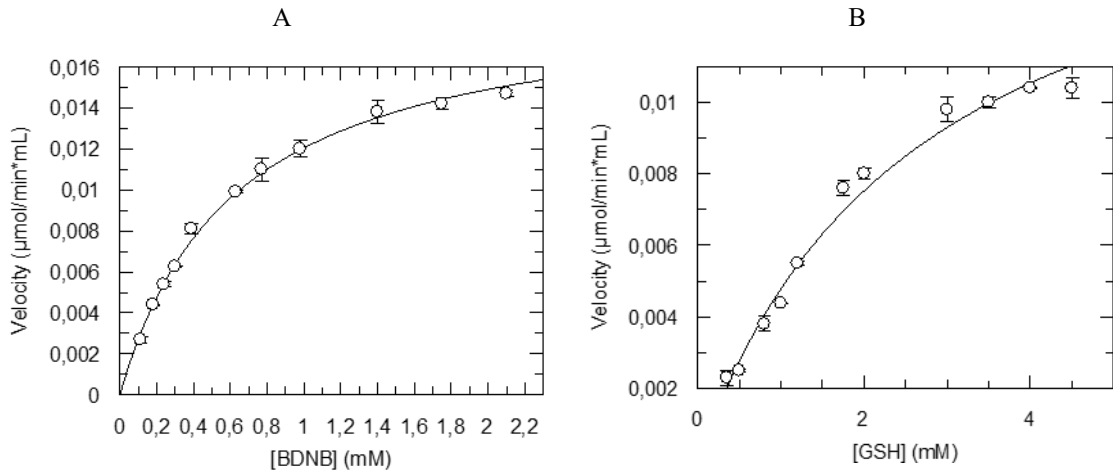
Εικόνα 3.8: Κινητική ανάλυση του ενζύμου N1 Ancient (**A**) με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (**B**) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το BDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.



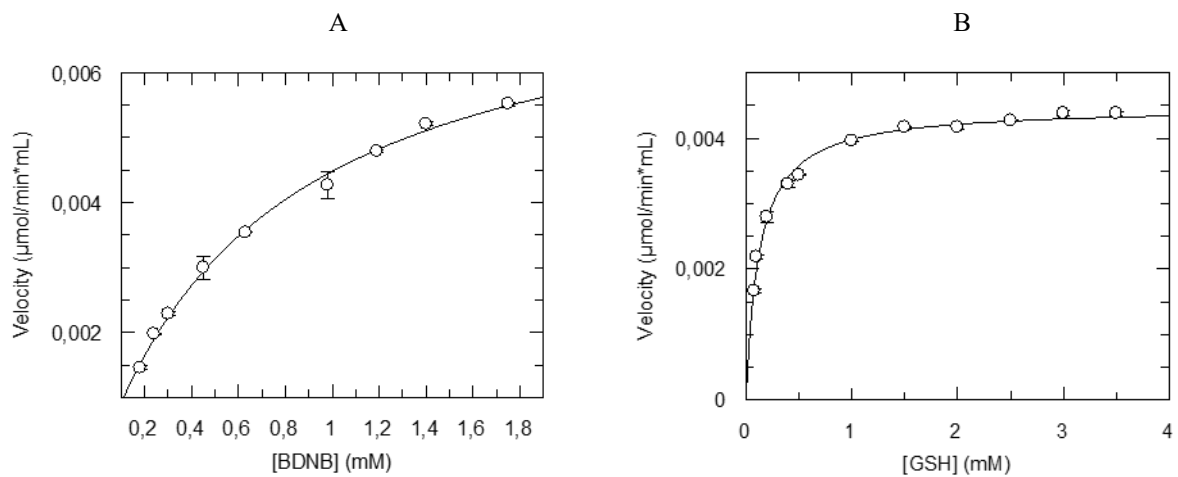
Εικόνα 3.9: Κινητική ανάλυση του ενζύμου N10 *AtuGST* (A) με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το BDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.



Εικόνα 3.10: Κινητική ανάλυση του ενζύμου N20 *Ancient* (A) με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το BDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.



Εικόνα 3.11: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *ThermoGST* (A) με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το BDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.



Εικόνα 3.12: Κινητική ανάλυση του ενζύμου N1 Tau (A) με το BDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το BDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

Πίνακας 3.6: Κινητική ανάλυση των αρχέγονων ενζύμων για το σύστημα BDNB/GSH.

| ENZYMΟ | ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ | BDNB | GSH |
|-------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| N1 Ancient | K_m (mM) | 0,86 ± 0,13 | 1,44 ± 0,17 |
| | k_{cat} (min ⁻¹) | 0,57 ± 0,07 | |
| | n_H | 1,4 | 1,57 |
| N10 AtuGST | K_m (mM) | 0,215 ± 0,084 | 0,12 ± 0,0052 |
| | k_{cat} (min ⁻¹) | 0,72 ± 0,09 | |
| | n_H | 2,38 | - |
| N20 Ancient | K_m (mM) | 0,383 ± 0,042 | 1,2 ± 0,137 |
| | k_{cat} (min ⁻¹) | 1,6 ± 0,1 | |
| ThermoGST | K_m (mM) | 0,58 ± 0,0295 | 2,27 ± 0,328 |
| | k_{cat} (min ⁻¹) | 3,47 ± 0,09 | |
| N1 Tau | K_m (mM) | 0,7493 ± 0,0499 | 0,1246 ± 0,0078 |
| | k_{cat} (min ⁻¹) | 1,17 ± 0,02 | |

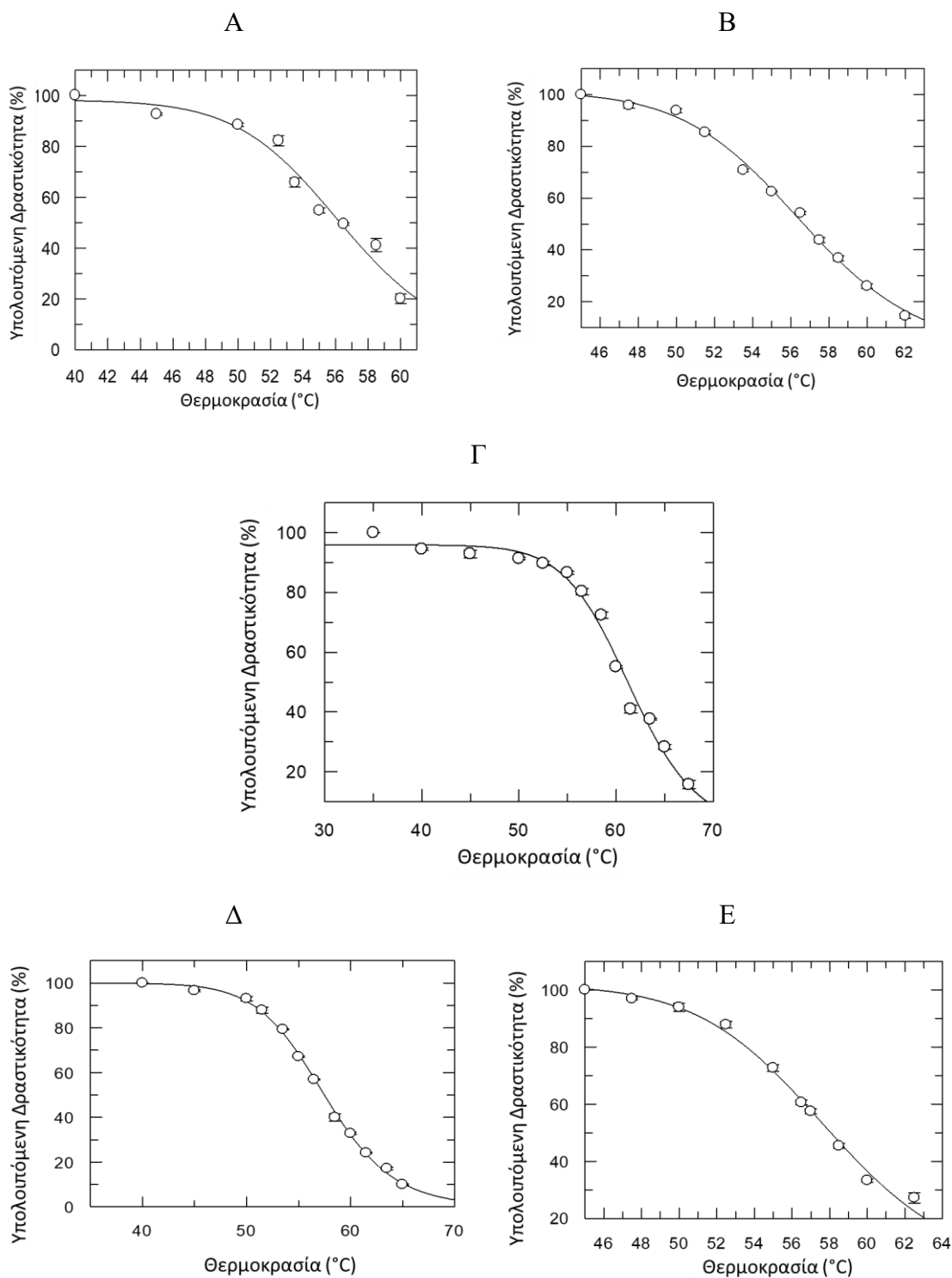
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.6, το N1 Ancient ως προς τα δυο υποστρώματα και το N10 AtuGST ως προς το BDNB ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα δεν ακολουθούν την κινητική των Michaelis-Menten. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8 (A) & (B) και στην Εικόνα 3.9 (A), υπάρχει σιγμοειδής εξάρτηση του υποστρώματος. Η παράμετρος n_H δείχνει την θετική ή αρνητική συνέργεια, όταν $n_H > 1$ όπως συμβαίνει στο N1 Ancient και στο N10 AtuGST τότε υπάρχει θετική συνέργεια.

Το N10 AtuGST έχοντας ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης την GSH, καθώς και τα υπόλοιπα τρία ένζυμα ως προς τα δυο υποστρώματα που μελετήθηκαν υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten.

3.3.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων

Ο σημαντικός ρόλος της θερμοκρασίας στην καταλυτική δράση των ενζύμων ήταν ο λόγος μελέτης της επίδρασης της στα αρχέγονα ένζυμα. Η διαδικασία αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 3.2.10.

Στην Εικόνα 3.13, φαίνεται η εξάρτηση της υπολειπόμενης δραστηριότητας με τη θερμοκρασία και για τα πέντε αρχέγονα ένζυμα.



Εικόνα 3.13: Καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης (Α) του ενζύμου N1 Tau, (Β) του ενζύμου *ThermoGST*, (Γ) του ενζύμου N20 Ancient, (Δ) του ενζύμου N1 Ancient και (Ε) του ενζύμου N10 *AtuGST*.

Επίσης, υπολογίστηκε η τιμή T_m , δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο χάνει το 50% της αρχικής του δραστηκότητας. Στον Πίνακα 3.7, παρουσιάζονται οι τιμές T_m για όλα τα αρχέγονα ένζυμα που μελετήθηκαν.

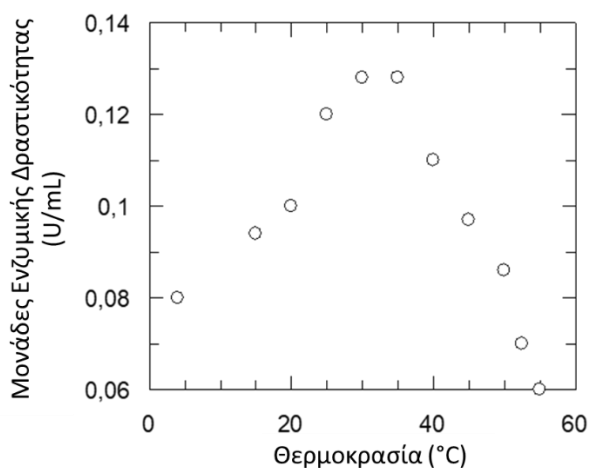
Πίνακας 3.7: Τιμή T_m για κάθε ένζυμο.

| Ένζυμο | T_m (°C) |
|-------------------|-----------------|
| N1 Tau | $56,4 \pm 0,47$ |
| <i>ThermoGST</i> | $56,6 \pm 0,18$ |
| N20 Ancient | $61,5 \pm 0,3$ |
| N1 Ancient | $57,5 \pm 0,13$ |
| N10 <i>AtuGST</i> | $57,9 \pm 0,23$ |

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι το πιο θερμοσταθερό από τα πέντε αρχέγονα ένζυμα είναι το N20 Ancient, το οποίο έχει την υψηλότερη τιμή T_m . Ακολουθούν με περίπου 4°C διαφορά τα N1 Ancient και N10 *AtuGST* και τα λιγότερο θερμοανθεκτικά με μόλις 1°C διαφορά από τα προηγούμενα είναι το N1 Tau και το *ThermoGST*.

3.3.8 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας για το ένζυμο N1 Ancient

Σύμφωνα με τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, το ένζυμο N1 Ancient φάνηκε να έχει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας μεταξύ 30-35°C. Στην Εικόνα 3.14, παρουσιάζεται η καμπύλη της θερμοκρασίας σε σχέση με την δραστηριότητα του ενζύμου.

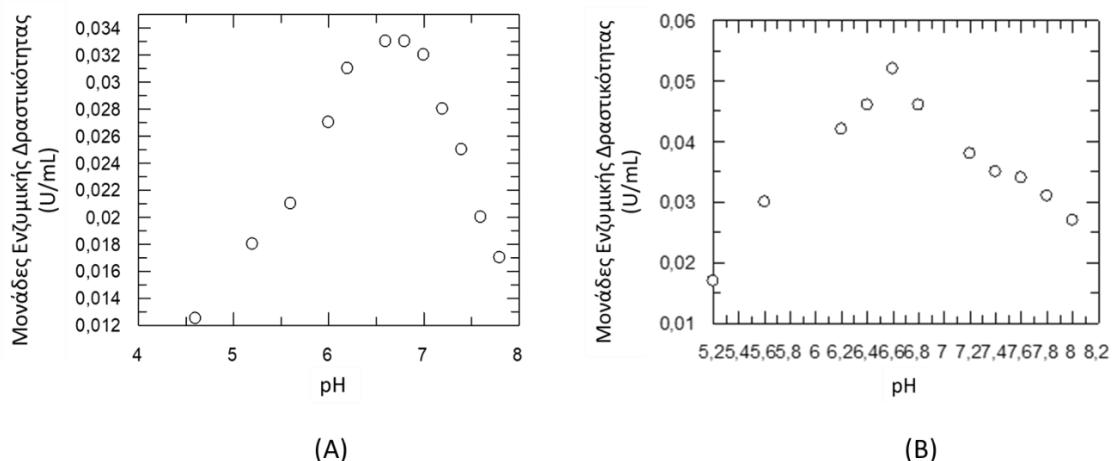


Εικόνα 3.14: Επίδραση της θερμοκρασίας στη ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης για το ένζυμο N1 Ancient.

3.3.9 Μελέτη της επίδρασης του pH για τα ένζυμα N1 Ancient και N1 Tau

Η μελέτη της επίδρασης του pH έδειξε ότι και τα δυο ένζυμα εμφανίζουν βέλτιστη λειτουργία σε σχετικά όξινα pH ~6,5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.15 (A) και (B). Σύμφωνα με την Εικόνα 3.15 A, το N1 Ancient εμφανίζει ένα μικρό πλατό

μεταξύ 6,5 και 6,7, ενώ το ένζυμο N1 Tau έχει ξεκάθαρα καλύτερη ενζυμική δραστηριότητα σε pH 6,5 (Εικόνα 3.15B).

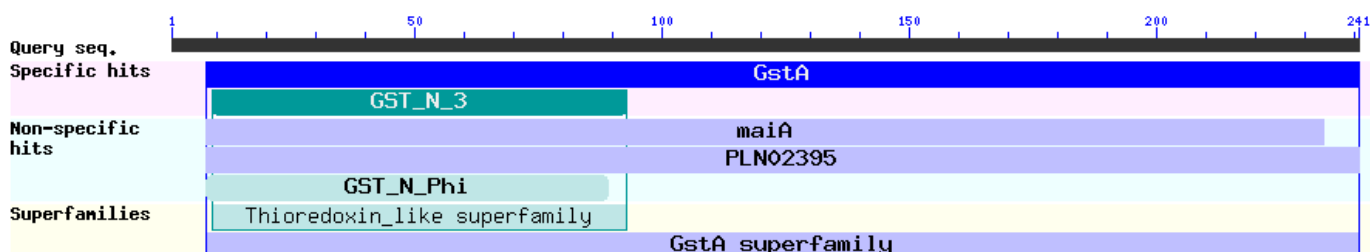


Εικόνα 3.15: Επίδραση του pH στη ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης (A) για το ένζυμο N1 Ancient και (B) για το ένζυμο N1 Tau.

3.3.10 Βιοϋπολογιστική μελέτη της δομής των αρχέγονων ενζύμων

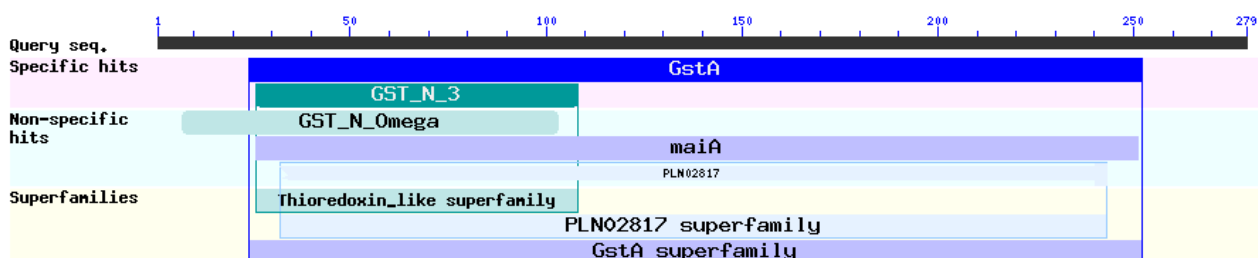
3.3.10.1 N1 Ancient

Ανάλυση της αλληλουχίας για την εύρεση συντηρημένων δομικών ενοτήτων (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) έδειξε ότι η αλληλουχία αντιπροσωπεύει έναν ενδιαφέροντα εξελικτικό κόμβο και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την τάξη *phi*.



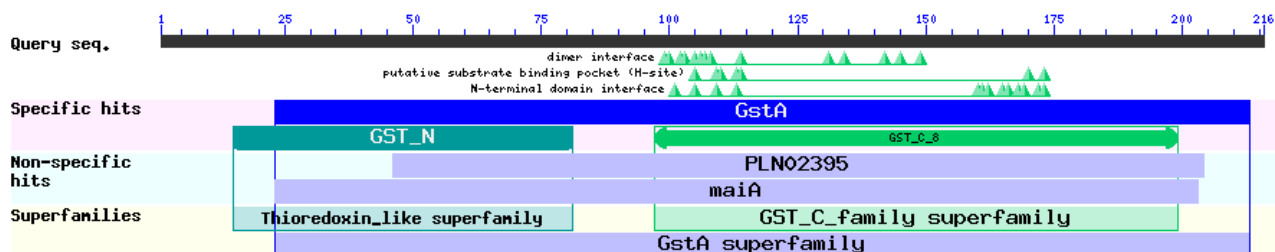
3.3.10.2 N20 Ancient

Ανάλυση της αλληλουχίας για την εύρεση συντηρημένων δομικών ενοτήτων (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) έδειξε ότι η αλληλουχία αντιπροσωπεύει έναν ενδιαφέροντα εξελικτικό κόμβο και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την τάξη *omega*.



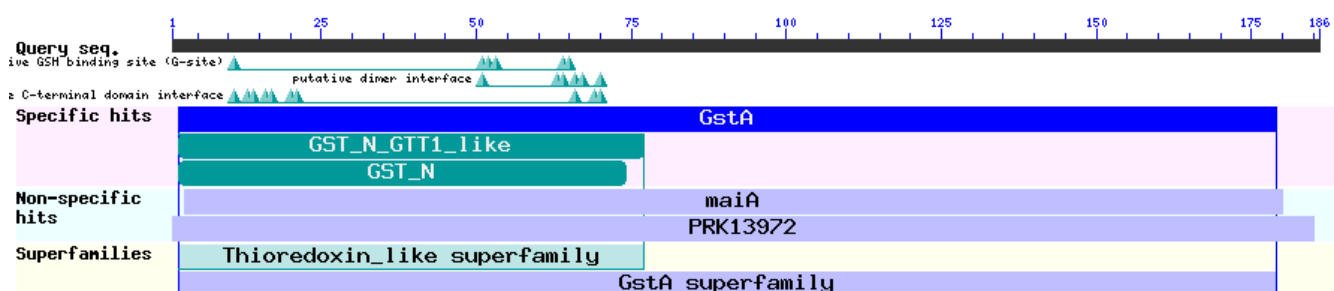
3.3.10.3 N10 *AtuGST*

Ανάλυση της αλληλουχίας για την εύρεση συντηρημένων δομικών ενοτήτων (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) έδειξε ότι η αλληλουχία αντιπροσωπεύει έναν ενδιαφέροντα εξελικτικό κόμβο και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με τις βακτηριακές GSTs.



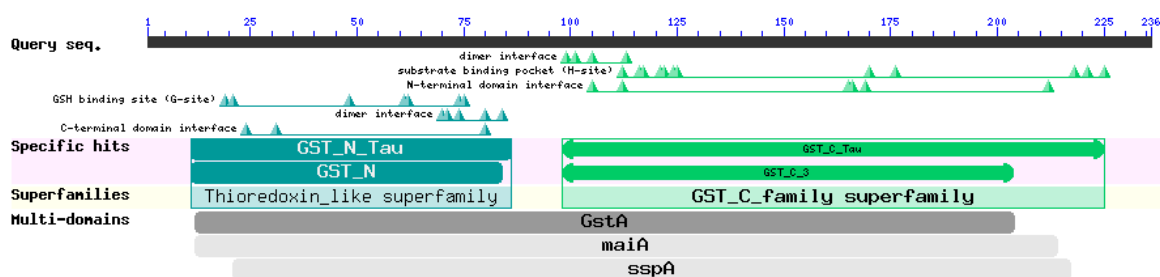
3.3.10.4 *ThermoGST*

Ανάλυση της αλληλουχίας για την εύρεση συντηρημένων δομικών ενοτήτων (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) έδειξε ότι η αλληλουχία αντιπροσωπεύει έναν ενδιαφέροντα εξελικτικό κόμβο και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την τάξη *chi*.



3.3.10.5 N1 *Tau*

Ανάλυση της αλληλουχίας για την εύρεση συντηρημένων δομικών ενοτήτων (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) έδειξε ότι η αλληλουχία αντιπροσωπεύει πρωτότυπο και ενδιαφέροντα εξελικτικό κόμβο που περιλαμβάνει δομική ομοιότητα με την τάξη *tau*.



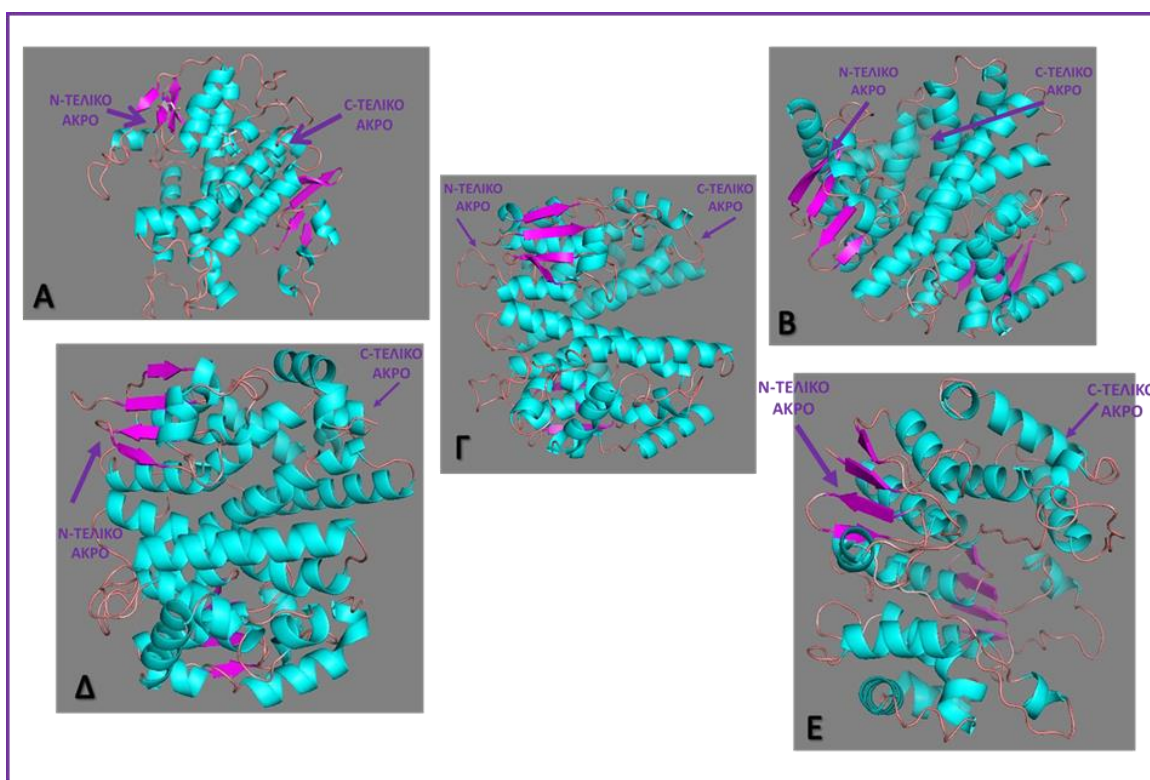
Τέλος, η αλληλουχία κάθε ενζύμου υποβλήθηκε σε ομόλογη μοντελοποίηση με το SWISS-MODEL, προκειμένου να προβλεφθεί η δομή τους. Στον Πίνακα 3.8, παρουσιάζονται οι

αριθμοί καταχώρησης των δομών που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες για τα αρχέγονα ένζυμα.

Πίνακας 3.8: Μήτρες στις οποίες βασίστηκε η ομόλογη μοντελοποίηση των αρχέγονων ενζύμων, κωδικοί PDB και το ποσοστό ομοιότητας.

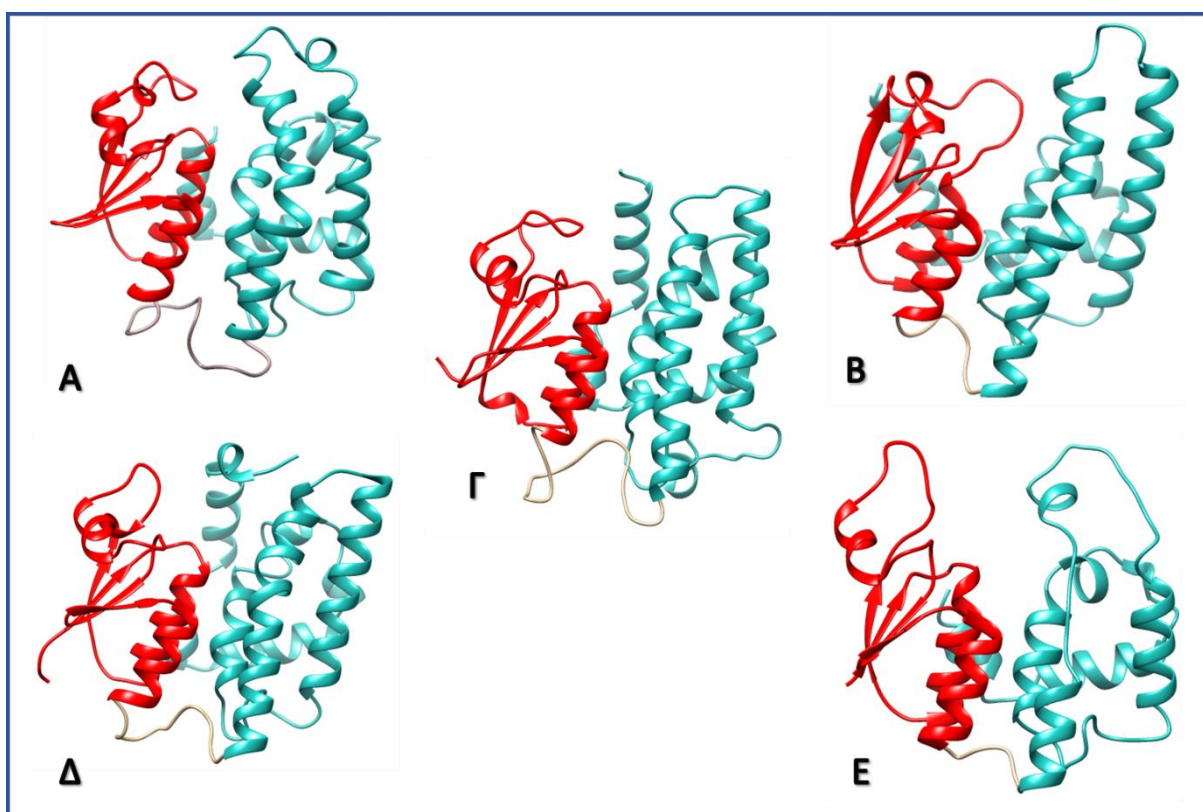
| Αρχέγονο Ένζυμο | Κωδικός PDB | Δομή | Ποσοστό ομοιότητας (%) |
|--------------------------|-------------|---|------------------------|
| N1 Ancient | 5f06.1.A | Glutathione S-transferase family protein | 40 |
| N10 <i>Atu</i>GST | 3lq7.1.A | Glutathione S-transferase | 69,5 |
| N20 Ancient | 1oyj.1.A | Glutathione S-transferase | 49,5 |
| <i>Thermo</i>GST | 4nhw.1.A | Glutathione S-transferase | 40,3 |
| N1 Tau | 2vo4.1.A | 2,4-D inducible glutathione S-transferase | 84,5 |

Στην Εικόνα 3.16, φαίνονται οι δομές των αρχέγονων ενζύμων όπως προβλέφθηκαν και παρατηρούνται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά αναφορικά με τις σχέσεις δομής και βιολογικής δράσης: κάθε υπομονάδα έχει χαρακτηριστική παρόμοια κανονική αναδίπλωση (GST fold), αποτελείται από 7 α -έλικες και 4 β -ελάσματα και διαχωρίζεται σε δύο δομικές ενότητες, τη N- και τη C-τελική δομική ενότητα.



Εικόνα 3.16: Βιοϋπολογιστική μελέτη των αρχέγονων μορφών. (Α) Δομή του N1 Ancient, (Β) δομή του N10 *Atu*GST, (Γ) δομή του N20 Ancient, (Δ) δομή του N1 Tau και (Ε) δομή του *Thermo*GST. Η πρόβλεψη της δομής έγινε με εφαρμογή μοντελοποίησης με ομολογία (homology modeling). Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα PyMol (DeLano, 2002).

Η N-τελική δομική ενότητα είναι όμοια με την θειορεδοξίνη και αποτελείται από β-ελάσματα και α-έλικες (βαβαββα), ενώ η C-τελική δομική ενότητα αποτελείται μόνο από α-έλικες (Εικόνα 3.17). Σε κάθε υπομονάδα του διμερούς υπάρχουν δυο ανεξάρτητες περιοχές δέσμησης υποστρώματος: μια εξειδικευμένη περιοχή που δεσμεύει το υπόστρωμα (G- θέση) στη N-τελική δομική ενότητα και μια μη εξειδικευμένη που δεσμεύονται τα υδρόφοβα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (H- θέση) στη C-τελική δομική ενότητα.



Εικόνα 3.17: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου (A) N1 Ancient, (B) N10 *Atu*GST, (Γ) N20 Ancient, (Δ) N1 Tau και (E) *Thermo*GST. Σε κάθε εικόνα, η N-τελική περιοχή απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και η C-τελική περιοχή με γαλάζιο. Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Η G-θέση είναι εξειδικευμένη θέση πρόσδεσης της GSH και αποτελείται από μια ομάδα συντηρημένων αμινοξέων της N-τελικής περιοχής (Board & Menon, 2013). Το αμινοξύ που παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση (καταλυτικό αμινοξύ) βρίσκεται συνήθως μετά την β1-πτυχωτή επιφάνεια και μπορεί να είναι σερίνη, τυροσίνη ή κυστεΐνη ανάλογα με την τάξη (Chronopoulou *et al.*, 2017). Σύμφωνα με την βιοϋπολογιστική μελέτη των αρχέγονων γονιδίων, το N1 Ancient ανήκει στην *phi* τάξη και το N1 Tau στην *tau* τάξη και έχουν ως καταλυτικό αμινοξύ την σερίνη Ser9 και Ser13, αντίστοιχα. Το N20 Ancient

ανήκει στην *omega* τάξη και έχει ως καταλυτικό αμινοξύ την κυστεΐνη Cys32. Όσον αφορά στο *ThermoGST*, ανήκει στην *chi* τάξη, της οποίας το καταλυτικό αμινοξύ δεν είναι ακόμα γνωστό.

Η Η-θέση είναι λιγότερο συντηρημένη και είναι υπεύθυνη για την ικανότητα των GSTs να εμφανίζουν ευρεία εκλεκτικότητα έναντι των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Liu *et al.*, 2015; Skopelitou *et al.*, 2015).

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναβίωση αρχέγονων μορφών διαφόρων ενζύμων είναι μια προσέγγιση που ολοένα και περισσότερο κερδίζει έδαφος, αφού δίνει τη δυνατότητα να προβλεφθούν δομές οι οποίες με την εξελικτική πορεία έχουν εκλείψει. Με αυτόν τον τρόπο, πηγάζουν αρκετές πληροφορίες τόσο για τις συνθήκες των παλαιότερων εποχών όσο και για τις ιδιότητες των μορφών των ενζύμων που υπήρχαν τότε. Επίσης, μέσω των συντηρημένων αμινοξέων, εντοπίζονται τα αμινοξέα-κλειδιά για τη δομή και τις λειτουργίες των ενζύμων (Merkel & Sterner, 2016).

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, η εφαρμογή του βιοϋπολογιστικού εργαλείου FastML έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν αλληλουχίες με διαφορετικές εξελικτικές σχέσεις με τις πατρικές. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν νέες GST αλληλουχίες σε διαφορετικούς εξελικτικούς κόμβους και θέσεις. Τα ένζυμα που σχεδιάστηκαν παρουσίασαν ομοιότητα με διάφορες τάξεις των GSTs. Συγκεκριμένα, το N1 Ancient παρουσιάζει ομοιότητα με την τάξη *phi*, ενώ το N1 Tau εμφανίζει ομοιότητα με την τάξη *tau*. Οι GSTs τόσο της *phi* όσο και της *tau* τάξης έχουν ως καταλυτικό αμινοξύ την σερίνη (Lallement *et al.*, 2014a), το ίδιο αμινοξύ έχουν και τα δυο συνθετικά αρχέγονα, το N1 Ancient και το N1 Tau. Έπειτα, το N20 Ancient έχει ομοιότητα με την τάξη *omega*, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο, το οποίο στη συγκεκριμένη τάξη είναι η κυστεΐνη (Ramkumar *et al.*, 2016), όπως και στο N20 Ancient, ενώ το N10 *Atu*GST εμφανίζει την συντηρημένη αναδίπλωση της θειορεδοξίνης. Τέλος, όσον αφορά στο *Thermo*GST, χρησιμοποιήθηκε ως αλληλουχία ελέγχου, αφού ανήκει στην τάξη *chi*, η οποία θεωρείται εξελικτικά πρόγονος και υφίσταται και σήμερα.

Ο βιοϋπολογιστικός σχεδιασμός μας παρείχε την δυνατότητα να αξιολογήσουμε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των GST ενζύμων διαφορετικών τάξεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι GSTs αποτελούνται από δυο δομικές ενότητες: τη N-τελική δομική ενότητα, η οποία είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή του ενζύμου και η οποία προέρχεται από την αναδίπλωση της θειορεδοξίνης και τη C-τελική δομική ενότητα, η οποία διαφοροποιείται μεταξύ των ενζύμων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η μεγάλη ετερογένεια στην οικογένεια των κυτταροπλασματικών GSTs, η οποία αποτελείται από ένζυμα που παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας μικρότερο του 25 % μεταξύ των διαφορετικών τάξεων (Oakley, 2005).

Όσον αφορά στην κινητική μελέτη των αρχέγονων ενζύμων, παρατηρήθηκε ικανοποιητική δραστηριότητα έχοντας ως υπόστρωμα το BDNB και με εξαίρεση το N1 Ancient και το N10 *Atu*GST τα οποία εμφάνισαν αλλοστερισμό με θετική συνέργεια, τα υπόλοιπα αρχέγονα

(N20 Ancient, *ThermoGST* και N1 Tau) υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten. Σχετικά με τη GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, το N1 Ancient παρουσίασε αλλοστερισμό με θετική συνέργεια, χωρίς όμως να έχει υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμα. Οι υπόλοιπες αρχέγονες μορφές ακολουθούν την εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten, ωστόσο ενώ τα N10 *AtuGST* και N1 Tau έχουν αρκετά μεγάλη συγγένεια, τα N20 Ancient και *ThermoGST* δεν παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με την GSH.

Αναφορικά με την εκλεκτικότητα των αρχέγονων μορφών έναντι πιθανών υποστρωμάτων, παρατηρήθηκε περιορισμένη εκλεκτικότητα και στις πέντε μορφές, συγκριτικά με άλλες GSTs. Η εξειδίκευση και η εκλεκτικότητα των αρχέγονων μορφών δεν έχει ακόμα μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο μελέτες σε αρχέγονες μορφές του ενζύμου β-λακταμάση δείχνουν ότι είναι μη εκλεκτικά και λιγότερο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τις σύγχρονες μορφές του ενζύμου (Wheeler *et al.*, 2016; Risso *et al.*, 2013). Ειδικότερα, το N20 Ancient λόγω της ομοιότητας του με GSTs της *omega* τάξης, καθώς επίσης και λόγω της κυστεΐνης ως καταλυτικό αμινοξύ, αναμενόταν να εμφανίσει δράση θειοτρανσφεράσης και διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης (Board, 2011), γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής. Έπειτα, το N1 Ancient εμφάνισε δράση υπεροξυδάσης με ένα από τα υπό μελέτη υποστρώματα και συγκεκριμένα το CuOOH όπως αναμενόταν, λόγω της ομοιότητάς του με GSTs της *phi* τάξης, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν τέτοια δράση (Pégeot *et al.*, 2014). Όσον αφορά στο N1 Tau, ενώ θα αναμενόταν να εμφανίζει δράση υπεροξυδάσης λόγω της σερίνης ως καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο (Pégeot *et al.*, 2017), δε φάνηκε να έχει τέτοια δράση με κανένα από τα τρία υποστρώματα που μελετήθηκαν. Τέλος, και τα τέσσερα συνθετικά αρχέγονα ένζυμα (N1 Ancient, N20 Ancient, N10 *AtuGST* και N1 Tau) φάνηκε να αποδέχονται ως υποστρώματα τόσο την HNE όσο και την HED και να εμφανίζουν κάποια χαμηλή και άλλα υψηλή δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό δείχνει την ομοιότητα τους με τις σημερινές μορφές των GSTs, αφού πρόκειται για υποστρώματα τα οποία είναι κοινώς αποδεκτά από πολλές τάξεις των συγκεκριμένων ενζύμων και μαρτυρούν την συμμετοχή τους σε διάφορες σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Zhang & Forman, 2017; Chronopoulou *et al.*, 2014b).

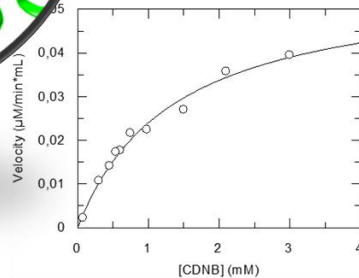
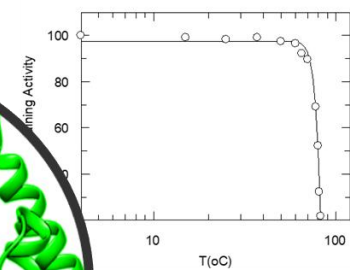
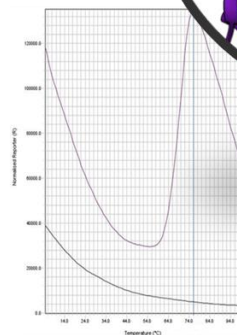
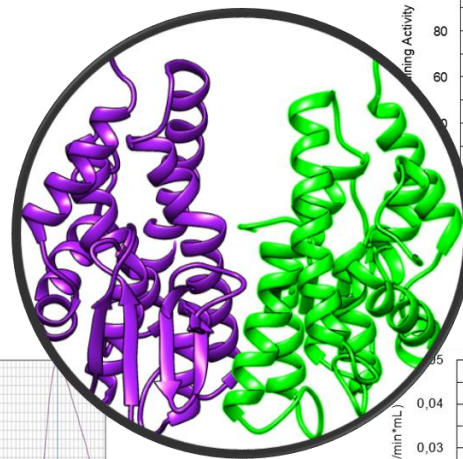
Η μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων έδειξε ότι παρόλο που πρόκειται για αρχέγονες μορφές δεν εμφάνισαν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα. Αυτό το γεγονός έρχεται σε αντίθεση με πειράματα που έχουν γίνει σε κάποια ένζυμα θειορεδοξίνης από την Προκάμβρια εποχή, τα οποία εμφάνισαν πολύ μεγάλη θερμοσταθερότητα (30°C πιο

σταθερά) (Perez-Jimenez *et al.*, 2011). Ωστόσο, συγκρίνοντας τις τιμές T_m των αρχέγονων μορφών με αυτές που εμφανίζουν οι σύγχρονοι τύποι μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, το N1 Tau εμφανίζει παρόμοια θερμοσταθερότητα με σημερινές GSTs της *tau* τάξης (Skopelitou *et al.*, 2016).

Η επίδραση της θερμοκρασίας αλλά και του pH παίζει πολύ σημαντικό ρόλο αφού επηρεάζει την σταθερότητα και τη στερεοδιάταξη του ενζύμου, τη συγγένεια του με τα υποστρώματα κ.α. (Κλώνης, 2007). Έτσι, για την αρχέγονη μορφή N1 Ancient μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και έδειξε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας του συγκεκριμένου ενζύμου κυμαίνεται μεταξύ 30-35°C. Αναφορικά με την επίδραση του pH, φαίνεται πως τόσο το N1 Ancient όσο και το N1 Tau εμφανίζουν βέλτιστο pH σε πιο όξινη περιοχή ~6,5 σε σχέση με τις σύγχρονες μορφές του ενζύμου, οι οποίες έχουν και ένα μικρό εύρος βέλτιστων pH (Pouliou *et al.*, 2017; Skopelitou *et al.*, 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs) ΑΠΟ ΦΥΤΑ *Glycine max* ΚΑΙ *Phaseolus vulgaris*



4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1.1 Φυτικές GSTs

Οι GSTs είναι πολυλειτουργικά ένζυμα, με κυριότερη λειτουργία την αποτοξίνωση του κυττάρου από ξενοβιοτικές, τοξικές ενώσεις (Chronopoulou *et al.*, 2014a). Στους φυτικούς οργανισμούς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην αποτοξίνωση αλλά αυξάνουν την αντοχή των φυτών σε διάφορες καταστάσεις καταπόνησης (Chen *et al.*, 2016; Mostofa *et al.*, 2014; Cho & Kong, 2007). Οι φυτικές GSTs πρωτομελετήθηκαν στον αραβόσιτο, λόγω της ικανότητας τους να προσδίδουν στο φυτό αντοχή στο ζιζανιοκτόνο ατραζίνη (Lamoureux *et al.*, 1970). Σήμερα, χάρη στην εξέλιξη της τεχνολογίας και την ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών όπως είναι η βιοϋπολογιστική, ολοένα και περισσότερα ισοένζυμα GSTs απομονώνονται και χαρακτηρίζονται ως προς τις διαφορετικές λειτουργίες τους (Li *et al.*, 2016). Οι περισσότερες φυτικές GSTs ανήκουν στην οικογένεια των κυτταροπλασματικών και χωρίζονται σε 12 τάξεις: *tau* (U), *phi* (F), *theta* (T), *zeta* (Z), *lamda* (L), *γ-υπομονάδα του παράγοντα επιμήκυνσης της ευκαρυωτικής μετάφρασης 1B* (EF1Bγ), *ρεδουκτάση του διυδροασκορβικού* (DHAR), *μεταταξίνη* (metataxin), *απαλογονάση της τετραχλωρο-υδροκινόνης* (TCHQD), *αιμερυθρίνη* (H), *iota* (I), *ρεδουκτάση της γλουταθειονυλ-υδροκινόνης* (GHR) (Jia *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014). Οι *tau* και *phi* είναι από τις πιο μεγάλες τάξεις στα φυτά και είναι αυτές που εμπλέκονται κυρίως στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώσεων (Labrou *et al.*, 2016; Chronopoulou *et al.*, 2012b). Μεταξύ των φυτικών GSTs, τα ένζυμα των τάξεων *theta* και *zeta* εμφανίζουν τον υψηλότερο βαθμό ομοιότητας (Mohsenzadeh *et al.*, 2011). Οι τάξεις *lamda* και DHARs έχουν διαφορετικές λειτουργίες από τις υπόλοιπες φυτικές τάξεις και ενώ οι DHARs πιθανόν λειτουργούν ως ρεδουκτάσες (Dixon & Edwards, 2010), για την *lamda* τάξη δεν υπάρχουν ακόμα πολλές πληροφορίες (Chan & Lam, 2014). Σχετικά με τα ένζυμα της TCHQD τάξης, η ομοιότητα με GSTs από άλλες τάξεις είναι 26-30 % και εντοπίζεται κυρίως στην N-τελική ενότητα (Arora & Bae, 2014).

Οι φυτικές GSTs, πέρα από τον ρόλο τους στην αποτοξίνωση του οργανισμού, συμμετέχουν και σε άλλες λειτουργίες, όπως βιοσύνθεση ή μεταφορά δευτερογενών μεταβολιτών, αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες κ.α. (Han *et al.*, 2016; Cummins *et al.*, 2011).

4.1.2 Διαφορική Σάρωση Φθορισμού (DSF)

Διάφορες μέθοδοι υπάρχουν για τη μελέτη των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών μιας πρωτεΐνης, όπως η διαφορική σάρωση θερμιδομετρίας (DSC), ο κυκλικός διχροϊσμός (CD) κ.α. (Seelig & Schönfeld, 2016). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν μεγάλα ποσά καθαρής αλλά και σταθερής πρωτεΐνης, τα οποία μπορεί να είναι δύσκολο να αποκτηθούν και έχουν μεγάλο χρόνο προετοιμασίας (Wright *et al.*, 2017; Niesen *et al.*, 2007). Η διαφορική σάρωση φθορισμού (Differential Scanning Fluorimetry-DSF) είναι μια εύκολη, γρήγορη και χωρίς την απαίτηση μεγάλων ποσών πρωτεΐνης, μέθοδος μελέτης της θερμοσταθερότητας των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η DSF παρακολουθεί τη θερμική αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης, παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής, σε όργανο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι ιδιαίτερα φθορίζουσα όταν βρεθεί σε μη πολικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα οι υδρόφοβες περιοχές μιας πρωτεΐνης που έχει αρχίσει να αποδιατάσσεται (Lea & Simeonov, 2012).

Η DSF έχει και άλλες εφαρμογές στην βιοχημεία και στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών καθώς επίσης και στην σάρωση πρωτεϊνών για διάφορους προσδέτες (Hofmann *et al.*, 2016). Αποτελεί μια μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης μιας πρωτεΐνης, να ελεγχθεί η επίδραση των μεταλλάξεων σε μια πρωτεΐνη ή ακόμα και να βρεθούν μικρές ενώσεις- σταθεροποιητές της πρωτεΐνης. Σε γενικές γραμμές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη του μηχανισμού δράσης μιας πρωτεΐνης (Simeonov, 2013; Seabrook & Newman, 2013).

Όταν μια ένωση προσδένεται στην πρωτεΐνη, τότε η ελεύθερη ενέργεια Gibbs αυξάνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η θερμοκρασία τήξης T_m (melting temperature) της πρωτεΐνης, λειτουργώντας ως δείκτης της ύπαρξης προσδέτη. Έρευνες έχουν δείξει ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας τήξης T_m σχετίζεται με την αναστολή της πρωτεΐνης ή τη συγγένεια με τον προσδέτη (Zubriené *et al.*, 2009). Οι GSTs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του τρόπου αναστολής από μικρές ενώσεις με τη χρήση διαφορικής σάρωσης φθορισμού και έχει φανεί ότι διαφορετικές ενώσεις δίνουν διαφορετικές καμπύλες αποδιάταξης του ενζύμου ανάλογα με το αν υπάρχει η GSH ή όχι. Συγκεκριμένα, οι αναστολείς-ανταγωνιστές της GSH εμφάνιζαν καμπύλες αποδιάταξης που είχαν εξάρτηση από την συγκέντρωση του αναστολέα. Επίσης, οι αναστολείς που σχημάτιζαν σύμπλοκα με την GSH σταθεροποιούσαν εξαιρετικά την πρωτεΐνη παρουσία GSH (Lea & Simeonov, 2012).

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, μελετήθηκαν τα ένζυμα GSTU8-8 από σόγια (*Glycine max*), GSTU2-2 από φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), καθώς επίσης και δυο μεταλλαγμένες μορφές του τελευταίου τα GSTU2-2.1 και GSTU2-2.10, τα οποία ανήκουν στην *tau* τάξη.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Βιολογικά υλικά

Το DNA των γονιδίων από το φυτό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) ήταν προσφορά της Δρος Χρονοπούλου Ευαγγελίας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το PnGSTU2-2 (άγριος τύπος), το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί ως πατρικό γονίδιο στην κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη (τεχνική DNA shuffling) και προέκυψε μια χμιαϊκή βιβλιοθήκη δέκα μεταλλαγμένων γονιδίων από τα οποία, βάσει της ενζυμικής δραστηριότητας, επιλέχθηκαν για μελέτη τα PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10. Τα παραπάνω γονίδια είναι κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]. Το cDNA από σόγια (*Glycine max*) ήταν προσφορά του Δρος Μάδεση Παναγιώτη (INEB, Θεσσαλονίκη).

Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

4.2.2 Σάρωση χμιαϊκής βιβλιοθήκης από το ένζυμο PnGSTU2-2

Ύστερα από κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη (DNA shuffling), που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο από την Δρα Χρονοπούλου Ευαγγελία έχοντας ως πατρικό γονίδιο το PnGSTU2-2, προέκυψε μια βιβλιοθήκη δέκα χμιαϊκών ενζύμων. Στην βιβλιοθήκη αυτήν πραγματοποιήθηκε σάρωση ώστε να βρεθούν οι πιο δραστικές μορφές ως προς το σύστημα CDNB/GSH.

4.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, προκειμένου να απομονωθεί η αλληλουχία του γονιδίου GSTU8-8 από το φυτό σόγια (*Glycine max*). Αρχικά, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, οι οποίοι φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν.

| ENZYMΟ | EKKINHTEΣ (5'→3') |
|------------------|---|
| EYΘYΣ | GAAGGAGATATACATATGATGGCTTCAAGTCAGGAGGAGGTGACCC |
| <i>GmGSTU8-8</i> | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΓATGGTGGTGATGATGCTATTTTGAACCAAAAAGGCTTTCATAGAGACCCTTG |

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μ L και περιείχαν:

- 10 pmol από κάθε εκκινητή
- 5 μ L μήτρα cDNA
- 0,5 mM dNTPs
- 25 μ L από 2X ρυθμιστικό διάλυμα HF
- 1 U Accura High Fidelity DNA πολυμεράση

και αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.

Οι συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Συνθήκες PCR για την απομόνωση του *GmGSTU8-8*.

| <i>ΣΤΑΔΙΑ</i> | <i>GmGSTU8-8</i> |
|--------------------------|------------------|
| <i>Αρχική αποδιάταξη</i> | 94°C για 30 s |
| <i>Αποδιάταξη</i> | 94°C για 15 s |
| <i>Υβριδισμός</i> | 65°C για 15 s |
| <i>Επιμήκυνση</i> | 72°C για 60 s |
| <i>Τελική επιμήκυνση</i> | 72°C για 600 s |
| <i>Κύκλοι</i> | 25 |

Μετά την απομόνωση του γονιδίου, το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης και πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα pETite C-His vector, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.13.

4.2.4 Μετασηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* σε κύτταρα *E. coli*

Κατόπιν μετασηματισμού κυττάρων *E. coli* HI-Control BL21 (DE3) με πλασμιδιακό DNA των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB έχοντας ως μέσο επιλογής αμπικιλίνη (100 μ g/mL) για τα *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* και καναμυκίνη (30 μ g/mL) για το *GmGSTU8-8*. Ο μετασηματισμός και η ετερόλογος έκφραση πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφοι 2.14 και 2.15, αντίστοιχα.

4.2.5 Καθαρισμός των ενζύμων GmGSTU8-8, PvGSTU2-2, PvGSTU2-2.1 και PvGSTU2-2.10 με χρωματογραφία συγγένειας

Έπειτα από την ετερόλογο έκφραση των ενζύμων και την λύση των κυττάρων που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.16, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας (§2.19). Οι δεσμευμένες GSTs εκλούστηκαν με διάλυμα 0,1 M Tris-HCl και 1 M NaCl pH 8,5 που περιείχε 10 mM GSH. Η ενζυμική δραστηριότητα των εκλούσεων προσδιορίστηκε φωτομετρικά όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20. Επίσης, υπολογίστηκε η συνολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.22. Η καθαρότητα των εκλούσεων αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (§2.24).

4.2.6 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου GmGSTU8-8 ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Για τον προσδιορισμό δραστηριότητας του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20. Προκειμένου να μελετηθεί η καταλυτική ποικιλότητα και η εκλεκτικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικοί προσδιορισμοί ως προς διάφορες ενώσεις που δυνητικά λειτουργούν ως υποστρώματα των GSTs. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.25.

4.2.7 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση),
- **CDNB:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - GmGSTU8-8: 0,05 – 2,7 mM
 - PvGSTU2-2: 0,15 – 3,6 mM
 - PvGSTU2-2.1: 0,075 – 3 mM
 - PvGSTU2-2.10: 0,3 – 5,25 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST, με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης, προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - *GmGSTU8-8*: 0,075 – 3 mM
 - *PvGSTU2-2*: 0,035 – 2,5 mM
 - *PvGSTU2-2.1*: 0,0025 – 2,5 mM
 - *PvGSTU2-2.10*: 0,01 – 2 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

4.2.8 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2* και *PvGSTU2-2.1*

Για τα πειράματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι του υποστρώματος CDNB σε θερμοκρασιακό εύρος:

- 4 – 80°C για το *PvGSTU2-2*
- 4 – 77,5°C για το *PvGSTU2-2.1*
- 4 – 80°C για το *GmGSTU8-8*

σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η υπολειπόμενη δραστηριότητα (%) ύστερα από επώαση 5 min σε κάθε θερμοκρασία και υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξεως των ενζύμων (T_m). Η T_m είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το ένζυμο χάνει το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας.

4.2.9 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων *GmGSTU8-8* και *PvGSTU2-2.1* με DSF

Για τον χαρακτηρισμό της σταθερότητας των ενζύμων πραγματοποιήθηκε DSF. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρακολουθεί την σταδιακή αποδιάταξη της πρωτεΐνης με τη βοήθεια μιας φθορίζουσας χρωστικής. Σε μη πολικό περιβάλλον, όπως οι υδρόφοβες θέσεις μιας αποδιαταγμένης πρωτεΐνης, η χρωστική είναι εξαιρετικά φθορίζουσα. Η ένταση του φθορισμού παριστάνεται γραφικά ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, δημιουργώντας μια σιγμοειδή καμπύλη. Η καμπύλη που σχηματίζεται περιγράφει τη μετάβαση από την μια κατάσταση στην άλλη και το σημείο καμπής της με την εξίσωση του Boltzmann επιδεικνύει την τιμή T_m (Wright *et al.*, 2017). Η παρακολούθηση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών από 4-99°C με ρυθμό αύξησης 1°C/min. Σε τελικό όγκο 20 μ L, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα | 5 μL |
| Χρωστική (8X) | 2,5 μ L |
| Ένζυμο | <i>GmGSTU8-8</i> : 1,56 μ g |
| | <i>PvGSTU2-2.1</i> : 12,6 μ g |
| Δις απιονισμένο νερό | Μέχρι τα 20 μ L |

Όσον αφορά στο *PvGSTU2-2.1*, μελετήθηκε η επίδραση ενός φυτοφαρμάκου, το οποίο φάνηκε να είναι ισχυρός αναστολέας του ενζύμου, καθώς επίσης η επίδραση της GSH και της S-έξυλ-GSH σε σύμπλοκο με το ένζυμο. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε, αφού έχει φανεί ότι η πρόσδεση άλλων μορίων στην πρωτεΐνη, τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με αυτήν, αυξάνει τη σταθερότητα της και άρα την τιμή T_m (Niesen *et al.*, 2007). Η διαδικασία και οι ποσότητες για αυτά τα πειράματα ήταν ίδιες με αυτά των πειραμάτων για τον προσδιορισμό της τιμής T_m . Ο αναστολέας μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις 20, 40 και 80 μ M. Η GSH και η S-έξυλ-GSH μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 17, 34 και 68 μ M.

4.2.10 Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην δραστηριότητα του ενζύμου *GmGSTU8-8*

Δύο από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την δραστηριότητα των ενζύμων είναι η θερμοκρασία και το pH. Αυτό συμβαίνει γιατί επηρεάζεται σημαντικά η σταθερότητα των ενζύμων και συνεπώς η στερεοδομή τους (Κλώνης, 2007). Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, μελετήθηκε η επίδραση των δυο αυτών παραγόντων στην ταχύτητα κατάλυσης της αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU8-8*. Συγκεκριμένα, η μελέτη

της εξάρτησης της ταχύτητας από τη θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 4-90°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5. Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Arrhenius:

$$\ln k = -E_a / RT + \ln A$$

Όπου k είναι η σταθερά ταχύτητας, E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol*K), T η απόλυτη θερμοκρασία και A η σταθερά Arrhenius ή παράγοντας συχνότητας. Αφού υπολογίστηκαν οι τιμές V_{max} κατασκευάστηκε το διάγραμμα $\ln V_{max}$ σε συνάρτηση με το αντίστροφο της θερμοκρασίας ($1/T$).

Η κλίση της ευθείας που προκύπτει ισούται, σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius, με $-E_a/R$ και έτσι μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης.

Στη συνέχεια, μπορούν να υπολογιστούν οι μεταβολές της εντροπίας (ΔS) αλλά και της ενθαλπίας (ΔH), χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Eyring:

$$\ln \frac{K_{cat}}{T} = -\frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T} + \ln \frac{K_B}{h} + \frac{\Delta S}{R}$$

Όπου K_{cat} είναι η σταθερά κατάλυσης, T η απόλυτη θερμοκρασία, ΔH η μεταβολή της ενθαλπίας, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol*K), K_B η σταθερά του Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J*K⁻¹), h η σταθερά του Plank ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J*s) και ΔS η μεταβολή της εντροπίας.

Όσον αφορά στην εξάρτηση της ταχύτητας από το pH, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε pH από 5 έως 8. Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κιτρικών ρυθμισμένα με τα επιθυμητά pH.

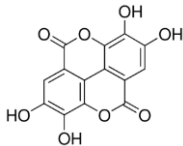
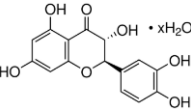
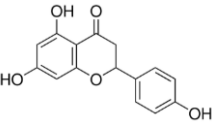
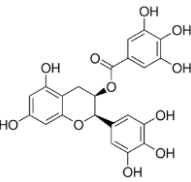
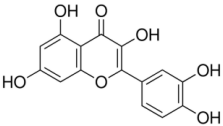
4.2.11 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8

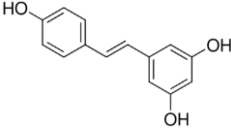
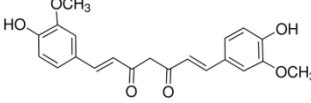
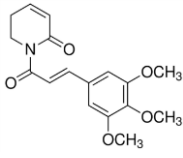
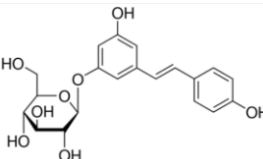
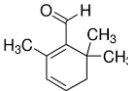
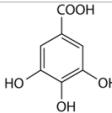
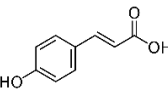
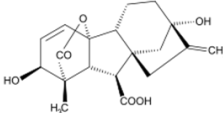
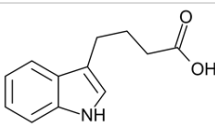
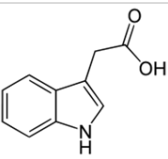
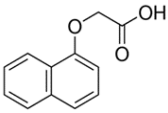
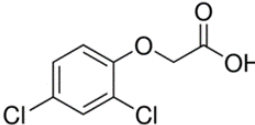
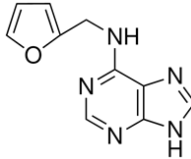
Οι GSTs εμφανίζουν την ικανότητα να δεσμεύουν διάφορες ενώσεις, οι οποίες δεν είναι υποστρώματα, σε μια ξεχωριστή θέση (L-θέση) (Dixon *et al.*, 2010). Τέτοιες ενώσεις μπορεί να είναι φλαβονοειδή όπως η κερσετίνη, ανθοκυανίνες, ορμόνες όπως η αυξίνη κ.α (Ahmad *et al.*, 2016). Για το συγκεκριμένο πείραμα, μελετήθηκε μια βιβλιοθήκη τέτοιων ενώσεων, προκειμένου να χαρακτηριστεί η L-θέση του ενζύμου GmGSTU8-8. Η αλληλεπίδραση των προϊόντων αυτών με το ένζυμο μετρήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου, αφού η δέσμευση των

ενώσεων αυτών μεταβάλλει την καταλυτική του δραστηριότητα. Από τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, οι περισσότερες διαλύθηκαν σε αιθανόλη, με εξαιρέσεις το ελλαγικό οξύ, το οποίο διαλύθηκε σε διάλυμα 1 M NaOH και την πολυδατίνη, όπως και τις φυτικές ορμόνες, οι οποίες διαλύθηκαν σε DMSO. Στον Πίνακα 4.3, φαίνονται οι φυσικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου με το σύστημα CDNB/GSH στους 37°C πριν και μετά την έκθεση του στα φυσικά προϊόντα. Σε τελικό όγκο 1 mL, προστέθηκαν στην κυψελίδα τα παρακάτω:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM
- **GSH:** 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Πιθανός αναστολέας:** 100 μM

Πίνακας 4.3: Οι φυσικές ενώσεις, οι δομές τους και η κατηγορία ενώσεων που ανήκουν.

| Ένωση | Δομή | Κατηγορία |
|-----------------------------|---|---------------|
| Ελλαγικό οξύ |  | Φαινόλη |
| (±)-ένυδρη Ταξιφολίνη |  | Φλαβονοειδές |
| (±)-Ναρινγενίνη |  | Φλαβονοειδές |
| (-)-Γαλλική Επιγαλοκατεχίνη |  | Υδροξυφαινόλη |
| Κερσετίνη |  | Φλαβονοειδές |

| | | |
|-------------------------------------|---|-----------------------|
| Ρεσβερατρόλη |  | Στιλβένιο-Φυτοαλεξίνη |
| Κουρκουμίνη |  | Υδροξυφαινόλη |
| Πιπερλονγουμίνη |  | Αλκαλοειδές |
| Πολυδατίνη |  | Στιλβένιο-Φυτοαλεξίνη |
| Σαφρανάλη |  | Μονοτερπενική αλδεΐδη |
| Γαλλικό οξύ |  | Φαινολικό οξύ |
| p-Κουμαρικό οξύ |  | Φαινολικό οξύ |
| Γιβεριλικό οξύ |  | Φυτική ορμόνη |
| Ίνδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA) |  | Φυτική ορμόνη-Αυξίνη |
| Ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA) |  | Φυτική ορμόνη-Αυξίνη |
| β-ναφθοξυοξικό οξύ (BNOA) |  | Φυτική ορμόνη-Αυξίνη |
| 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ |  | Ζιζανιοκτόνο |
| Κινετίνη |  | Φυτική ορμόνη |

4.2.12 Σάρωση αναλόγων της GSH ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου GmGSTU8-8

Πραγματοποιήθηκε σάρωση μιας βιβλιοθήκης αναλόγων του υποστρώματος GSH. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου με το σύστημα CDNB/GSH στους 37°C πριν και μετά την έκθεση του στους πιθανούς αναστολείς. Σε τελικό όγκο 1 mL, προστέθηκαν στην κυψελίδα τα παρακάτω:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM
- **GSH:** 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Πιθανός αναστολέας:** 100 μM

Πίνακας 4.4: Οι ενώσεις πιθανοί αναστολείς της GSH και οι δομές τους.

| Ένωση | Δομή |
|---------------------------------|------|
| S-(4-νιτροβένζυλο)-GSH | |
| Ανηγγμένη S-έξυλ-L-GSH | |
| Γλουταθειοσουλφονικό οξύ | |
| S-μέθυλο-GSH | |

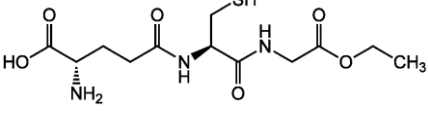
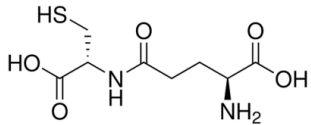
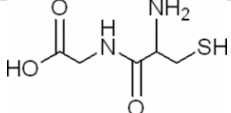
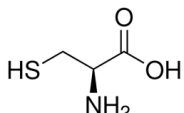
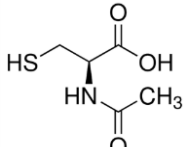
4.2.13 Σάρωση ενώσεων αναλόγων της GSH ως πιθανών υποστρωμάτων του ενζύμου GmGSTU8-8

Προκειμένου να μελετηθεί η καταλυτική ποικιλότητα του ενζύμου GmGSTU8-8, πραγματοποιήθηκε σάρωση μιας βιβλιοθήκης ενώσεων-αναλόγων GSH. Τα παραπάνω υποστρώματα διαλύθηκαν σε δις απιονισμένο νερό. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου στους 37°C χρησιμοποιώντας τα ανάλογα GSH ως υποστρώματα αντί της GSH. Σε τελικό όγκο 1 mL, προστέθηκαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM
- **Ανάλογο GSH:** 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Στον Πίνακα 4.5, παρουσιάζονται οι δομές των πιθανών υποστρωμάτων.

Πίνακας 4.5: Τα πιθανά υποστρώματα και οι δομές τους.

| Υπόστρωμα | Δομή |
|----------------------|--|
| Αιθυλεστέρας της GSH |  |
| γ-Glu-Cys |  |
| Cys-Gly |  |
| Κυστεΐνη |  |
| N-ακέτυλ-L-κυστεΐνη |  |

4.2.14 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10

Προκειμένου να αξιολογηθεί μια ένωση ως πιθανός αναστολέας ακολουθείται ένα πρωτόκολλο συγκεκριμένων ενεργειών. Αυτό το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη σάρωση των υποψήφιων αναστολέων, την επιλογή των ισχυρότερων αναστολέων, τον υπολογισμό της συγκέντρωσης IC₅₀ για κάθε επιλεγμένο αναστολέα, την διευκρίνιση του τρόπου λειτουργίας και του είδους της αναστολής και τέλος την κινητική μελέτη και τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής K_i για κάθε επιλεγμένο αναστολέα.

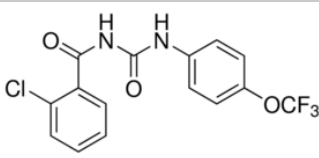
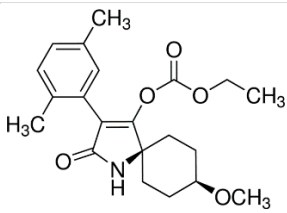
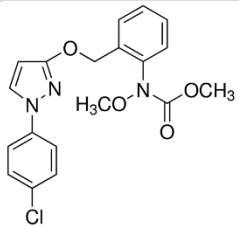
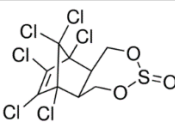
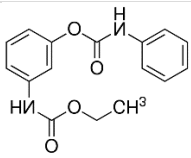
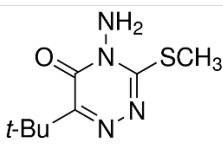
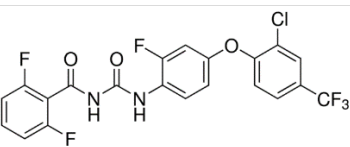
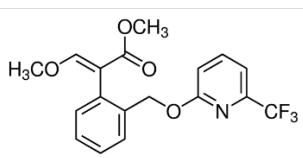
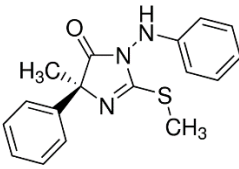
Για τον προσδιορισμό της αναστολής των GSTs από διάφορες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δραστηριότητάς τους στους 37°C πριν και μετά την έκθεση τους σε αυτές. Όλες οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις διαλύθηκαν σε ακετόνη. Σε τελικό όγκο 1 mL, περιέχονταν τα εξής:

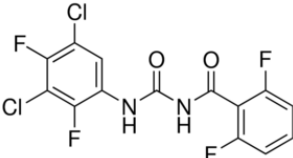
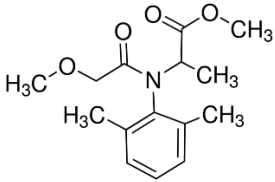
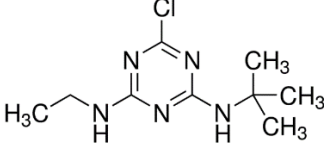
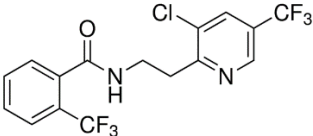
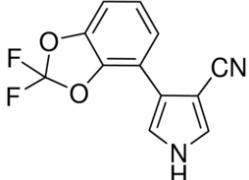
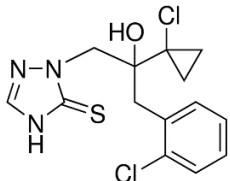
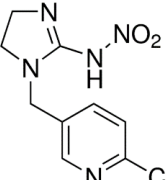
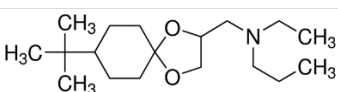
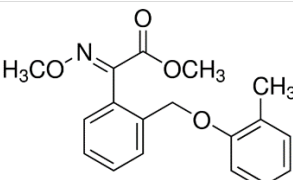
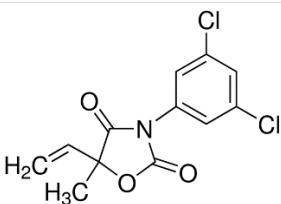
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM
- **GSH:** 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Πιθανός αναστολέας:** 100 μM

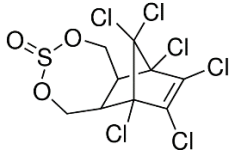
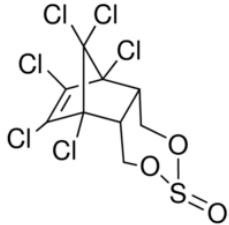
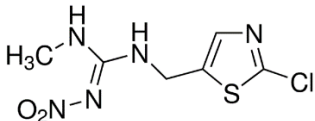
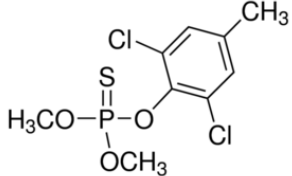
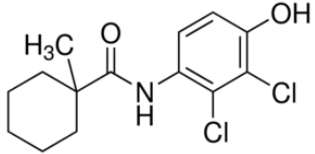
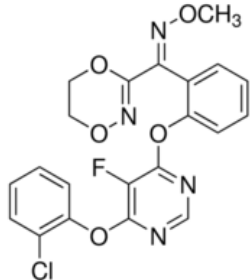
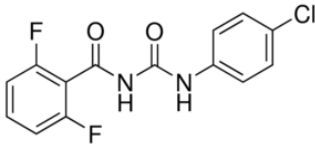
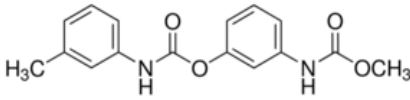
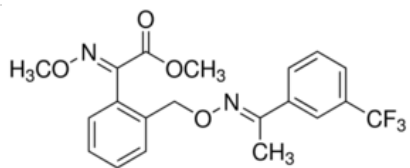
Πιο αναλυτικά, η σάρωση περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.28.

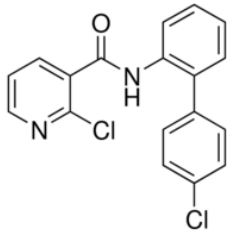
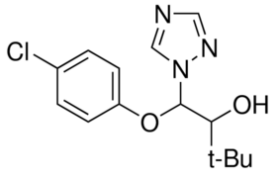
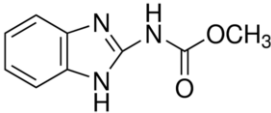
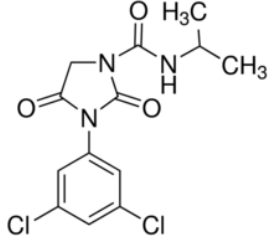
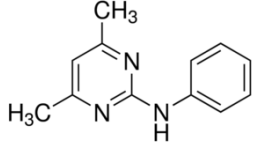
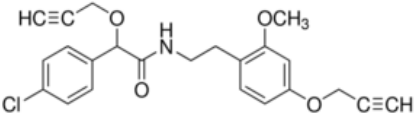
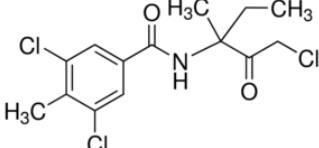
Στον Πίνακα 4.6, παρουσιάζονται οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις, που μελετήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς.

Πίνακας 4.6: Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι δομές τους και η κατηγορία στην οποία ανήκουν.

| Φυτοπροστατευτική ένωση | Δομή | Κατηγορία |
|-------------------------|--|--|
| Triflumuron |  | Εντομοκτόνο Φαινυλακυλουρία |
| Spirotetramat |  | Εντομοκτόνο Εστέρας τετρονικού οξέος |
| Pyraclostrobin |  | Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |
| β – endosulfan |  | Εντομοκτόνο Οργανοχλωριωμένο |
| Desmedipham |  | Ζιζανιοκτόνο Διφαινυλικός αιθέρας |
| Metribuzin |  | Ζιζανιοκτόνο Τριαζίνη |
| Flufenoxuron |  | Εντομοκτόνο Φαινυλακυλουρία |
| Picoxystrobin |  | Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |
| Fenamidone |  | Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |

| | | |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Teflubenzuron |  | Εντομοκτόνο Φαινυλακυλουρία |
| Metalaxyl |  | Μυκητοκτόνο Ανιλίδιο |
| Terbutylazine |  | Ζιζανιοκτόνο Τριαζίνη |
| Fluopyram |  | Μυκητοκτόνο Βενζαμίδιο |
| Fludioxonil |  | Μυκητοκτόνο Φαινυλοσπυρρολικό |
| Prothioconazole |  | Μυκητοκτόνο Τριαζόλιο |
| Imidacloprid |  | Εντομοκτόνο Νεοκοτινοειδές |
| Spiroxamine |  | Μυκητοκτόνο Σπιροκεταλαμίνη |
| Kresoxim-methyl |  | Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |
| Vinclozolin |  | Μυκητοκτόνο Δικαρβοξιμίδιο |

| | | |
|-------------------------|--|--|
| Endosulfan |  | Εντομοκτόνο Οργανοχλωριωμένο |
| α – endosulfan |  | Εντομοκτόνο Οργανοχλωριωμένο |
| Clothianidin |  | Εντομοκτόνο Νεοκοτινοειδές |
| Tolclofos-methyl |  | Μυκητοκτόνο Οργανοφωσφορικός εστέρας |
| Fenhexamid |  | Μυκητοκτόνο Ανιλίδιο |
| Fluoxastrobin |  | Εντομοκτόνο Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |
| Diflubenzuron |  | Εντομοκτόνο Φαινυλακυλουρία |
| Phenmedipham |  | Ζιζανιοκτόνο Διφαινυλικός αιθέρας |
| Trifloxystrobin |  | Μυκητοκτόνο Στρομπιλουρίνη |

| | | |
|------------------------|--|---------------------------------------|
| Boscalid |  | Μυκητοκτόνο Ανιλίδιο |
| Triadimenol |  | Μυκητοκτόνο Τριαζόλιο |
| Carbendazim |  | Μυκητοκτόνο Βενζιμιδαζόλιο |
| Iprodione |  | Μυκητοκτόνο Δικαρβοξιμίδιο |
| Pyrimethanil |  | Μυκητοκτόνο Ανίλικο-πυριμιδίνη |
| Mandipropamid |  | Μυκητοκτόνο Ζιζανιοκτόνο Αμίδιο |
| Zoxium Zoxamide |  | Μυκητοκτόνο Βενζαμίδιο |

4.2.15 Υπολογισμός της τιμής IC₅₀

Η τιμή IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) ορίζεται ως η συγκέντρωση αναστολέα που επιφέρει 50 % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

Για τον υπολογισμό του IC₅₀, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές (enzyme assays) στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου αναστολέα. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου PnGSTU2-2.1 υπό την

παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοπροστατευτικού Teflubenzuron με ένα εύρος τιμών από 0,001-0,11 mM.

4.2.16 Κινητική μελέτη αναστολής του ενζύμου PnGSTU2-2.1 ως προς το teflubenzuron

Δεδομένου ότι η αντίδραση που καταλύεται από την GST απαιτεί την παρουσία δύο υποστρωμάτων, η κινητική μελέτη αναστολής για την επιλεγμένη ένωση απαιτεί επιμέρους κινητικές μελέτες για κάθε ένα από τα δυο υποστρώματα χωριστά.

4.2.16.1 Κινητική μελέτη αναστολής του PnGSTU2-2.1 έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η PnGSTU2-2.1 με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **CDNB:** 0,45 - 3 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Αναστολέας:** οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη Παράγραφο 4.3.15

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

4.2.16.2 Κινητική μελέτη αναστολής του PnGSTU2-2.1 έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η PnGSTU2-2.1 με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** 0,0625 – 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

- **Αναστολέας:** οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη Παράγραφο 4.3.16

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

4.2.17 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i

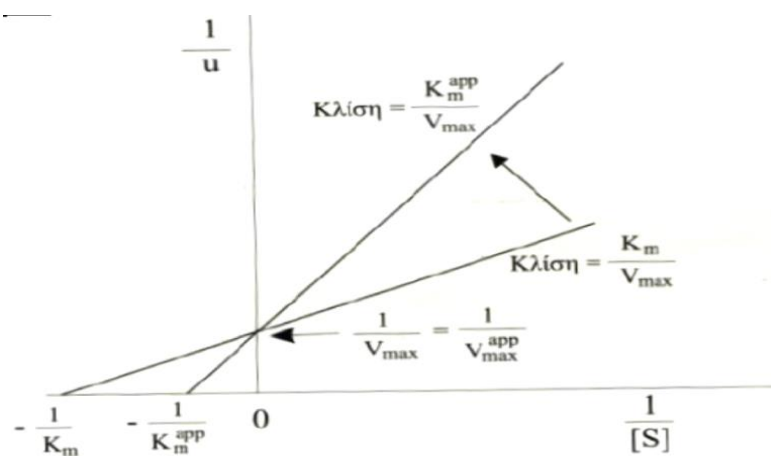
4.2.17.1. Υπολογισμός της σταθεράς συναγωνιστικής αναστολής

Για τη σταθερά συναγωνιστικής αναστολής K_i του συμπλόκου EI ισχύει:

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

Ο υπολογισμός της K_i πραγματοποιείται γραφικά, ξεκινώντας τη γραφική παράσταση των διπλών αντιστρόφων Lineweaver- Burk (Εικόνα 4.1) από την οποία λαμβάνουμε τις κλίσεις των ευθειών (slopes) και δημιουργούμε ένα δευτερογενές γράφημα των κλίσεων έναντι των διαφορών συγκεντρώσεων αναστολέα ($[I]$).

Αυτό το δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει ευθεία γραμμή, εάν πρόκειται για καθαρή (γραμμική) συναγωνιστική αναστολή, όπου το σημείο τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα (των X) του γραφήματος ισούται με $-K_i$.



Εικόνα 4.1: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης (u) συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος ($[S]$), παρουσία και απουσία αναστολέα για την περίπτωση συναγωνιστικής αναστολής (Κλώνης, 2007).

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

4.2.17.2. Υπολογισμός της σταθεράς μικτής αναστολής

Η μικτή αναστολή (ή αλλιώς μη συναγωνιστική αναστολή) συχνά αποτελεί συνδυασμό συναγωνιστικής και ανταγωνιστικής αναστολής (στη δεύτερη, ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES), οπότε και έχει δυο σταθερές αναστολής, την K_i (για το σύμπλοκο EI) και την K_i' (για το σύμπλοκο ESI). Η μεν K_i υπολογίζεται όπως η σταθερά συναγωνιστικής αναστολής (§ 4.2.17.1) (εάν πρόκειται για ‘καθαρή’-γραμμική περίπτωση), η δε K_i' υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το δευτερογενές γράφημα τομών-Y (δηλαδή της τομής των ευθειών του πρωτογενούς γραφήματος διπλών αντιστρόφων στον κάθετο άξονα των Y) έναντι των διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα ($[I]$), οπότε το αντίστοιχο δευτερογενές γράφημα θα πρέπει να απεικονίζει ευθεία γραμμή, εάν πρόκειται για καθαρή (γραμμική) μικτή αναστολή, όπου το σημείο τομής της ευθείας στον οριζόντιο άξονα (των X) του δευτερογενούς γραφήματος ισούται με K_i' .

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

4.2.17.3. Υπολογισμός της σταθεράς ανταγωνιστικής αναστολής

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

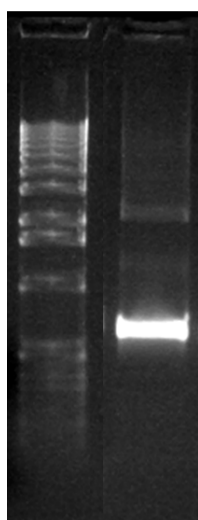
4.2.18 Βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου *GmGSTU8-8*

Η αλληλουχία του ενζύμου *GmGSTU8-8* υποβλήθηκε στο εργαλείο ομόλογης μοντελοποίησης SWISS-MODEL, προκειμένου να προβλεφθεί η δομή του. Η δομή που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τη μελέτη του συγκεκριμένου ενζύμου έχει αριθμό καταχώρησης 4j2f.

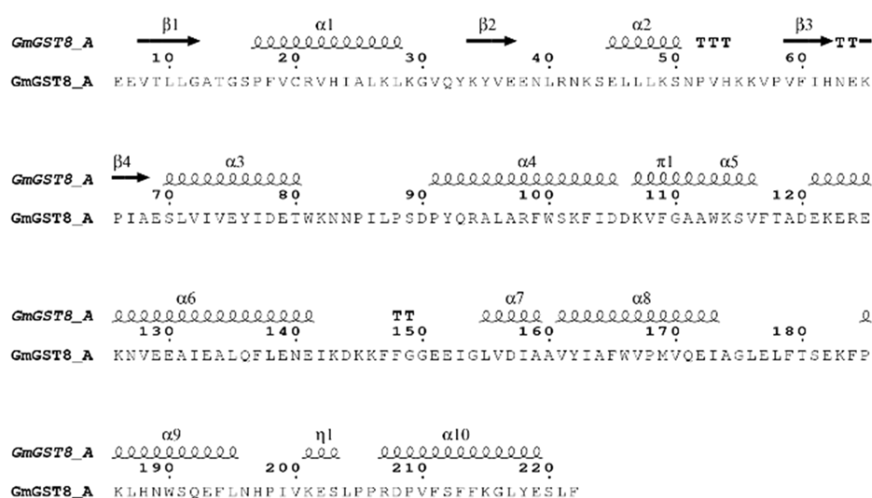
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 Απομόνωση του γονιδίου του *GmGSTU8-8* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της PCR, απομονώθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο *GmGSTU8-8*. Οι εκκινήτες και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται αναλυτικά στη Παράγραφο 4.2.2. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (1 % w/v) (Εικόνα 4.3A). Στην Εικόνα 4.3B, παρουσιάζεται η πρωτεϊνική αλληλουχία του ενζύμου.



A



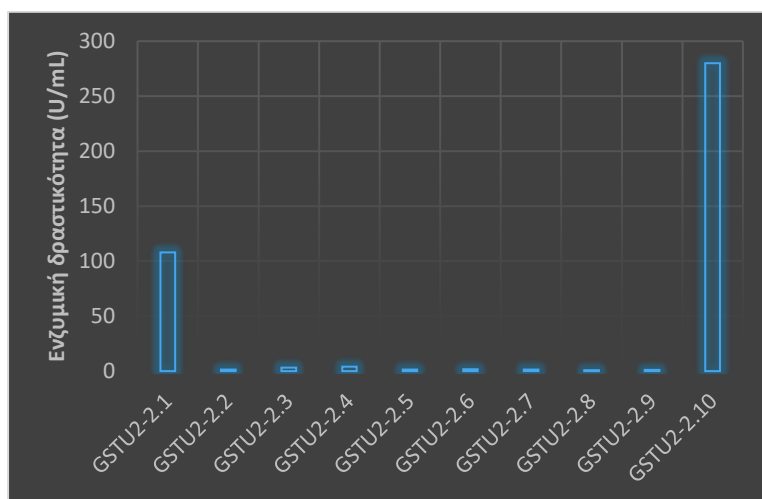
B

Εικόνα 4.3: (A) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης (1 %). Αριστερά φαίνεται ο δείκτης μοριακών βαρών και δεξιά το προϊόν της αντίδρασης (650 bp). (B) Πρωτεϊνική αλληλουχία του ενζύμου *GmGSTU8-8*.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του γονιδίου στον πλασμιαδικό φορέα pETite C-His vector, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.13.

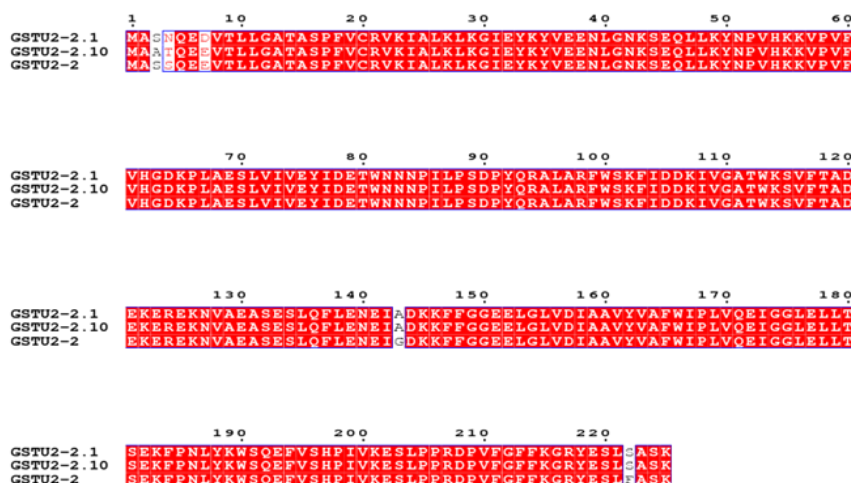
4.3.2 Σάρωση βιβλιοθήκης χμαιοικόν ενζύμων

Στη χμαιοική βιβλιοθήκη του ενζύμου PnGSTU2-2 (Chronopoulou *et al.*, 2012b), πραγματοποιήθηκε μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιώντας το σύστημα GSH/CDNB (§2.20) και επίσης υπολογίστηκε η συνολική πρωτεΐνη του εκχυλίσματος (μέθοδος Bradford) (§2.22), με σκοπό να επιλεγούν νέες μορφές του ενζύμου PnGSTU2-2 με αυξημένη δραστηριότητα.



Εικόνα 4.4: Τα χμαιοικά ένζυμα που προέκυψαν και η ενζυμική τους δραστηριότητα ως προς το σύστημα CDNB/GSH.

Σύμφωνα με την Εικόνα 4.4, επιλέχθηκαν οι μορφές PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10 για περαιτέρω μελέτη. Στην Εικόνα 4.5, παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση των χμαιοικών ενζύμων που επιλέχθηκαν μαζί με τον άγριο τύπο.



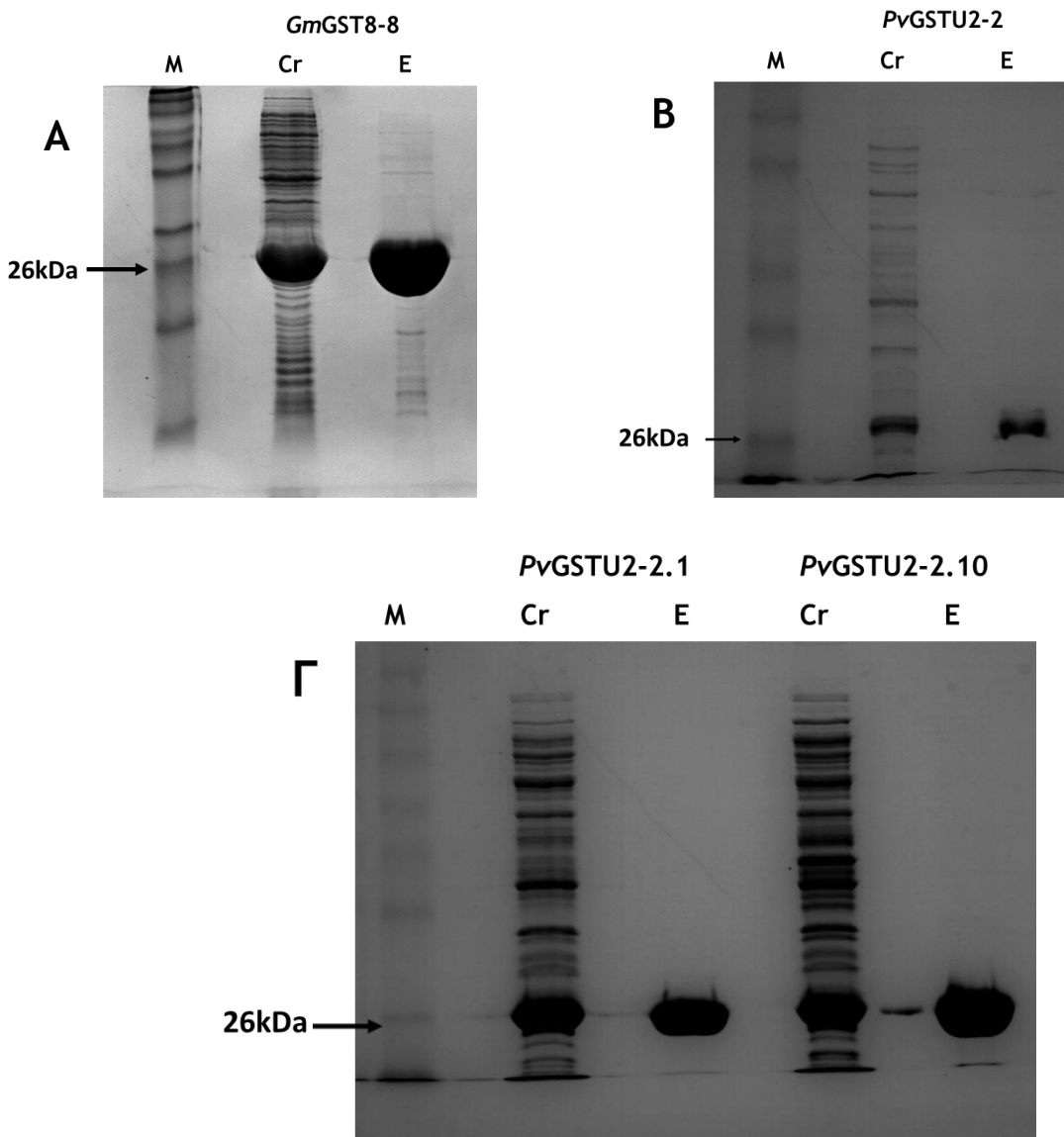
Εικόνα 4.5: Πολλαπλή γραμμική στοίχιση των ενζύμων PnGSTU2-2, PnGSTU2-2.1 και PnGSTU2-2.10. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ESPript.

4.3.3 Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων *E. coli* και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*

Έχοντας πλασμιδιακό DNA των τεσσάρων φυτικών γονιδίων, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3), όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.14. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό διάλυμα LB-άγαρ έχοντας ως αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 mg/mL) για το ένζυμο *GmGSTU8-8* και αμπικιλίνη (100 mg/mL) για τα ένζυμα *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*. Η ετερόλογος έκφραση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.15.

4.3.4 Καθαρισμός των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* με χρωματογραφία συγγένειας

Τα υπό μελέτη ένζυμα καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας με την διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.19. Τα ένζυμα εκλούστηκαν με 10 mM GSH διαλυμένη σε διάλυμα αναγέννησης I (0,1 M Tris-HCl και 1 M NaCl pH 8,5). Η απόδοση του καθαρισμού για το ένζυμο *GmGSTU8-8* ήταν ιδιαίτερα υψηλή 99,4 %. Όσον αφορά στα ένζυμα *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*, οι αποδόσεις ήταν αρκετά καλές 48,3 %, 60 % και 57 %, αντίστοιχα. Η επιτυχία του καθαρισμού επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. (A) M: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, Cr: Ενζυμικό παρασκεύασμα πριν τον καθαρισμό (crude) του ενζύμου *GmGSTU8-8*, E: Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλουσης καθαρής πρωτεΐνης του ενζύμου *GmGSTU8-8*. (B) M: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, Cr: Ενζυμικό παρασκεύασμα πριν τον καθαρισμό (crude) του ενζύμου *PvGSTU2-2*, E: Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλουσης καθαρής πρωτεΐνης του ενζύμου *PvGSTU2-2*. (Γ) M: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, Cr: Ενζυμικό παρασκεύασμα πριν τον καθαρισμό (crude) των ενζύμων *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*, αντίστοιχα, E: Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων καθαρής πρωτεΐνης των ενζύμων *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 4.7, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των καθαρισμών και για τα τέσσερα ένζυμα.

Πίνακας 4.7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του πρωτόκολλου καθαρισμού των υπό μελέτη ενζύμων.

| Ένζυμο | Κλάσματα | Συνολική δραστηριότητα (Units) | Ειδική Δραστηριότητα SA (Units/mg) | Καθαρισμός (φορές) | Ανάκτηση (%) |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------|
| <i>Gm</i> GSTU8-8 | Ακατέργαστο εκχύλισμα | 167 | 7.6 | 1 | 100 |
| | Καθαρισμένο ένζυμο | 166 | 21.3 | 3 | 99.4 |
| <i>Pv</i> GSTU2-2 | Ακατέργαστο εκχύλισμα | 9.3 | 0.31 | 1 | 100 |
| | Καθαρισμένο ένζυμο | 4.5 | 18 | 58 | 48.3 |
| <i>Pv</i> GSTU2-2.1 | Ακατέργαστο εκχύλισμα | 118 | 6.7 | 1 | 100 |
| | Καθαρισμένο ένζυμο | 71 | 13.1 | 2 | 60 |
| <i>Pv</i> GSTU2-2.10 | Ακατέργαστο εκχύλισμα | 178 | 5.7 | 1 | 100 |
| | Καθαρισμένο ένζυμο | 102 | 25.5 | 5 | 57 |

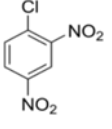
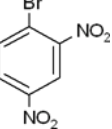
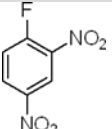
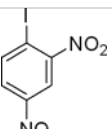
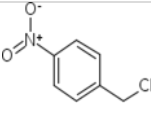
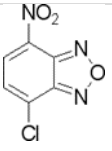
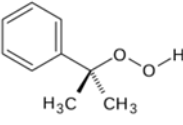
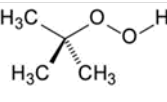
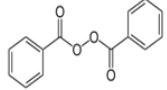
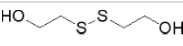
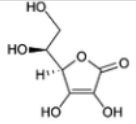
Για την περαιτέρω μελέτη, τα ένζυμα υποβλήθησαν σε διαπίδυση με διάλυμα φωσφορικών pH 6,5, προκειμένου να απομακρυνθεί το NaCl.

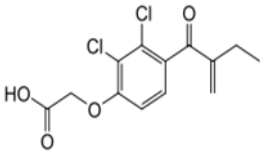
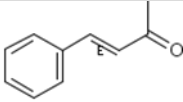
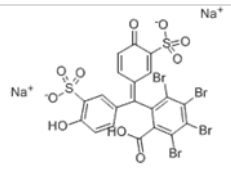

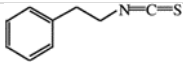
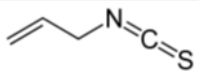
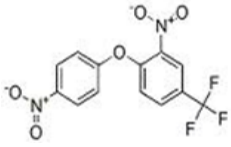
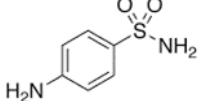
4.3.5 Μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου *GmGSTU8-8*

Το ένζυμο *GmGSTU8-8* στην καθαρή του μορφή μελετήθηκε ως προς την εκλεκτικότητά του έναντι μιας βιβλιοθήκης ενώσεων-πιθανών υποστρωμάτων των GSTs. Στον Πίνακα 4.8, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι GSTs καταλύουν δυο τύπους αντιδράσεων: (α) αντιδράσεις στις οποίες η GSH δημιουργεί σύμπλοκα (αντιδράσεις σύζευξης) και (β) αντιδράσεις στις οποίες η GSH οξειδώνεται (π. χ δράση υπεροξειδάσης) (Deponte, 2013). Το συγκεκριμένο ένζυμο φαίνεται να καταλύει

ένα μεγάλο εύρος και των δυο τύπων αντιδράσεων, αφού από τα συνολικά 19 υποστρώματα που μελετήθηκαν φαίνεται να καταλύει τη μετατροπή σε 12 από αυτά. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όλες οι αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν (CDNB, BDNB, FDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl) αποτελούν αποδεκτά υποστρώματα. Προκειμένου να εξεταστεί η δράση υπεροξειδάσης του συγκεκριμένου ενζύμου, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά υποστρώματα (CuOOH, tert BuOOH, Benzoyl peroxide). Το *GmGST8-8* δέχεται ως υποστρώματα το CuOOH και το βενζοϊκό υδροϋπεροξείδιο, εμφανίζοντας μεγαλύτερη δραστηριότητα με το τελευταίο ενώ δεν εμφανίζει καθόλου δραστηριότητα με το tert BuOOH. Η HNE αποτελεί τελικό προϊόν υπεροξειδωσης λιπιδίων και προέρχεται από το οξειδωτικό στρες (Awasthi *et al.*, 2017). Οι GSTs καταλύουν την αποτοξίνωση και απομάκρυνση της από το κύτταρο (Balogh & Atkins, 2011). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα παρακάτω αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι το ένζυμο *GmGST8-8* καταλύει την συγκεκριμένη αντίδραση. Το ένζυμο *GmGST8-8* επίσης δοκιμάστηκε ως προς τη δράση τόσο διυδροασκορβικής ρεδοκτάσης όσο και θειοτρανσφεράσης, χρησιμοποιώντας το DHA και τη HED αντίστοιχα, χωρίς όμως να καταλύει τις αντιδράσεις αυτές. Όσον αφορά στο EA και στην trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη, το υπό μελέτη ένζυμο εμφανίζει μια πολύ μικρή δραστηριότητα. Επίσης, το *GmGSTU8-8* καταλύει την αντίδραση προσθήκης της θειόλης της GSH στον ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας, έχοντας ως υπόστρωμα το PEITC, σχηματίζοντας διθειοκαρβαμίδια, αλλά δεν καταλύει την ίδια αντίδραση με υπόστρωμα το AITC. Τέλος, το ένζυμο δεν αναγνωρίζει ως υποστρώματα ούτε την BSP, ούτε το Fluorodifen, ούτε την σουλφανιλαμίδα.

Πίνακας 4.8: Ειδική δραστικότητα του ενζύμου *GmGST8-8* ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα.

| Υπόστρωμα | Δομή | Ειδική Δραστικότητα (SA) (U/mg) |
|---|---|---------------------------------|
| 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) |  | 21,3 |
| 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) |  | 36,6 |
| 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB) |  | 121,1 |
| 1-ιώδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) |  | 72,9 |
| π-νιτροβένζυλ-χλωρίδιο (PNBC) |  | 2,8 |
| 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) |  | 30 |
| Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH) |  | 3,84 |
| t-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tert-BuOOH) |  | M.A. |
| Βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο (benzoyl peroxide) |  | 4,16 |
| 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) |  | M.A. |
| Διυδροασκορβικό οξύ (DHA) |  | M.A. |

| | | |
|--|---|--------|
| Εθακρινικό οξύ (EA) |  | 0,04 |
| trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη |  | 0,0096 |
| Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) |  | M.A. |
| Trans-2-ενενάλη (HNE) |  | 0,104 |
| Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) |  | 0,4 |
| Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC) |  | M.A. |
| Fluorodifen |  | M.A. |
| Σουλφαναμίδη |  | M.A. |

*M.A.: Μη Ανιχνεύσιμο

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές δοκιμές με ενώσεις-ανάλογα της GSH. Στον Πίνακα 4.9, φαίνονται οι ενώσεις που μελετήθηκαν και η ενζυμική δραστηριότητα της κάθε ένωσης συγκριτικά με την GSH που είναι το φυσικό υπόστρωμα των GSTs. Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα, το *GmGSTU8-8* είναι ιδιαίτερα εκλεκτικό με την GSH, με μοναδική εξαίρεση τον αιθυλεστέρα της GSH, ο οποίος εμφανίζει 156 % δραστηριότητα σε σχέση με τη δραστηριότητα με την GSH ως υπόστρωμα. Σχετικά με τα υπόλοιπα ανάλογα της GSH, το ένα από αυτά (γ -Glu-Cys) εμφανίζει μια πολύ μικρή ενζυμική δραστηριότητα, ενώ όλα τα άλλα φαίνεται να μην είναι υποστρώματα του ενζύμου. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την G-θέση, η οποία χαρακτηρίζεται ως η πιο συντηρημένη περιοχή των GSTs και πολύ εξειδικευμένη για την πρόσδεση της GSH (Zompra *et al.*, 2016).

Πίνακας 4.9: Ενώσεις-ανάλογα GSH και η % ενζυμική δραστηριότητα.

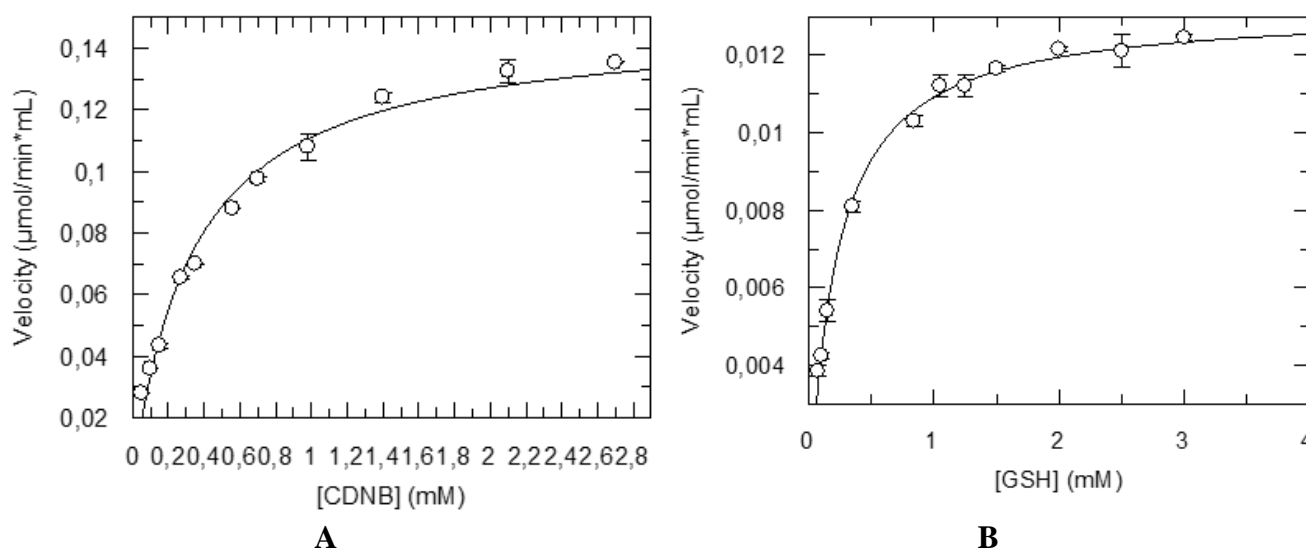
| Υπόστρωμα | Ενζυμική Δραστηριότητα (%) |
|----------------------|----------------------------|
| GSH | 100 |
| Αιθυλεστέρας της GSH | 156 |
| γ -Glu-Cys | 19,7 |
| Cys-Gly | M.A. |
| Κυστεΐνη | M.A. |
| N-ακέτυλ-L-κυστεΐνη | M.A. |

*M.A.: Μη Ανιχνεύσιμο

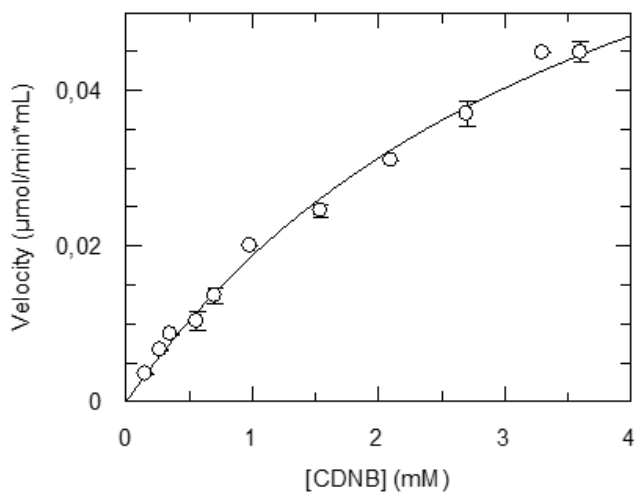
4.3.6 Κινητική μελέτη των ενζύμων *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των παραπάνω φυτικών ενζύμων ως προς τα δυο υποστρώματα, προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράμετροι K_m και k_{cat} (Πίνακας 4.10).

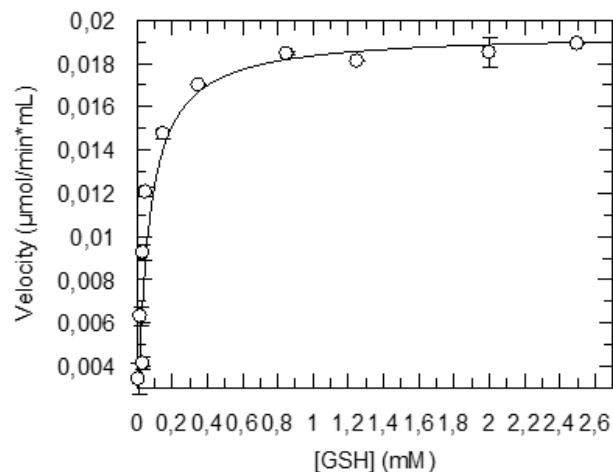
Η κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 4.2.7.



Εικόνα 4.7: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *GmGSTU8-8* (A) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

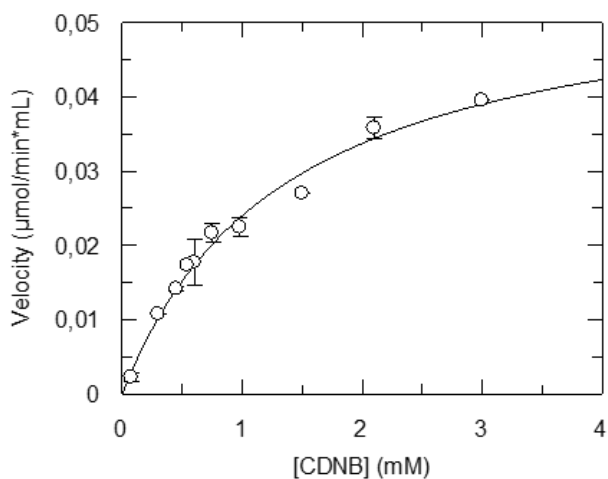


A

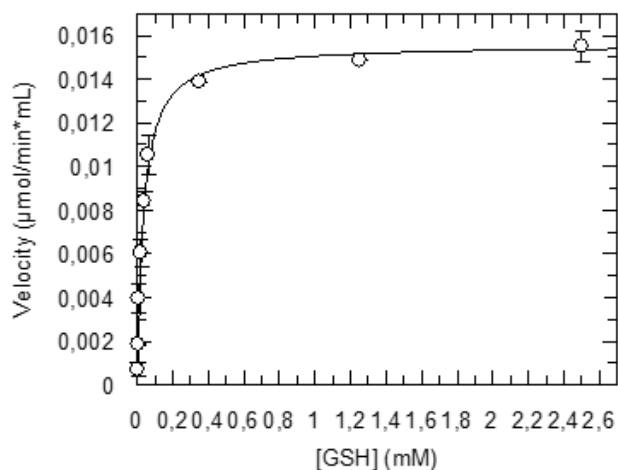


B

Εικόνα 4.8: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTU2-2* (**A**) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (**B**) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

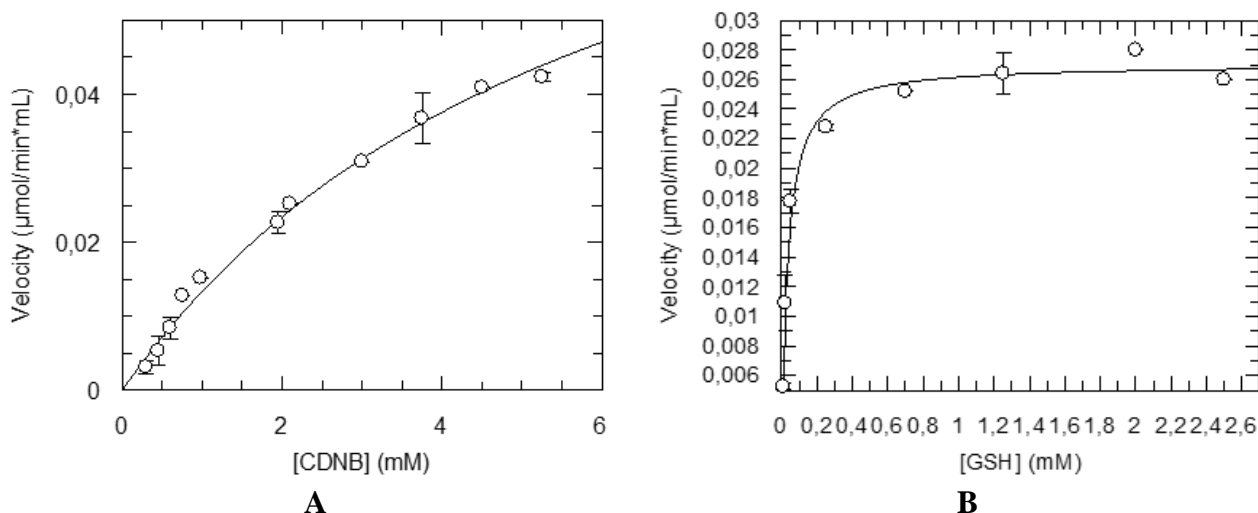


A



B

Εικόνα 4.9: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PnGSTU2-1* (**A**) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (**B**) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.



Εικόνα 4.10: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *PvGSTU2-2.10* (A) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

Πίνακας 4.10: Κινητική ανάλυση των *GmGSTU8-8*, *PvGSTU2-2*, *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* για το σύστημα CDNB/GSH.

| ENZYMΟ | KINHΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ | CDNB | GSH |
|---------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|
| <i>GmGSTU8-8</i> | K_m (mM) | $0,33 \pm 0,038$ | $0,21 \pm 0,0093$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | 1070 ± 40 | |
| <i>PvGSTU2-2</i> | K_m (mM) | $4,02 \pm 0,57$ | $0,057 \pm 0,0128$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | 1932 ± 188 | |
| <i>PvGSTU2-2.1</i> | K_m (mM) | $1,36 \pm 0,177$ | $0,034 \pm 0,029$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | 783 ± 57 | |
| <i>PvGSTU2-2.10</i> | K_m (mM) | $3,14 \pm 0,79$ | $0,03 \pm 0,0036$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | 1700 ± 300 | |
| | n_H | 1,26 | - |

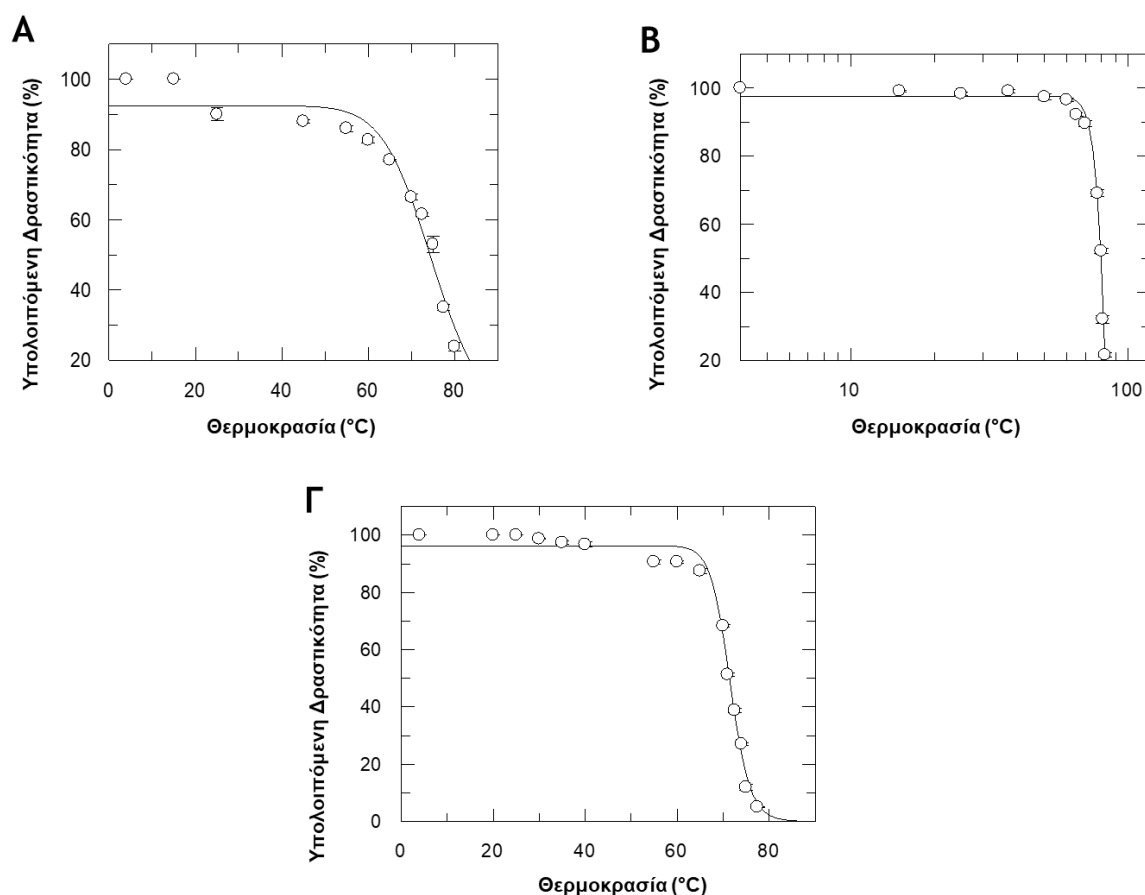
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το ένζυμο GSTU8-8 από σόγια ακολουθεί Michaelis-Menten. Η χαμηλή τιμή της K_m ως προς την GSH δείχνει την υψηλή συγγένεια του ενζύμου με το συγκεκριμένο υπόστρωμα και σημαίνει ότι είναι ικανό να καταλύει αντιδράσεις, όταν η GSH βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Chronopoulou *et al.*, 2014).

Όσον αφορά στα ένζυμα *PvGSTU2-2* και *PvGSTU2-2.1*, η κινητική ανάλυση ως προς τα δυο υποστρώματα ακολουθεί Michaelis-Menten. Ωστόσο, οι τιμές K_m ως προς το CDNB δεν υποδεικνύουν μεγάλη συγγένεια, αφού είναι αρκετά υψηλές, ενώ οι τιμές K_m ως προς

την GSH είναι πολύ χαμηλές, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες ενζύμων της συγκεκριμένης τάξης (Skopelitou *et al.*, 2016; Chronopoulou *et al.*, 2014). Σε αντίθεση με τα άλλα ένζυμα, που η κινητική και των δυο υποστρωμάτων υπακούουν στην εξίσωση των Michaelis-Menten, η κινητική του PnGSTU2-2.10 ως προς CDNB παρουσιάζει σιγμοειδή εξάρτηση με θετική συνέργεια, ενώ η κινητική ως προς GSH υπακούει στην εξίσωση των Michaelis-Menten και βάσει της τιμής K_m εμφανίζει υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμα.

4.3.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων GmGSTU8-8, PnGSTU2-2 και PnGSTU2-2.1

Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη Παράγραφο 4.2.8. Σύμφωνα με τις καμπύλες θερμικής αδρανοποίησης του κάθε ενζύμου (Εικόνα 4.11), προσδιορίστηκαν οι τιμές T_m , δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο χάνει το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας. Στον Πίνακα 4.11, παρουσιάζονται οι τιμές T_m για κάθε ένζυμο.



Εικόνα 4.11: Καμπύλες θερμικής αδρανοποίησης για το ένζυμο GmGSTU8-8 (A), για το ένζυμο PnGSTU2-2 (B) και για το ένζυμο PnGSTU2-2.1 (Gamma).

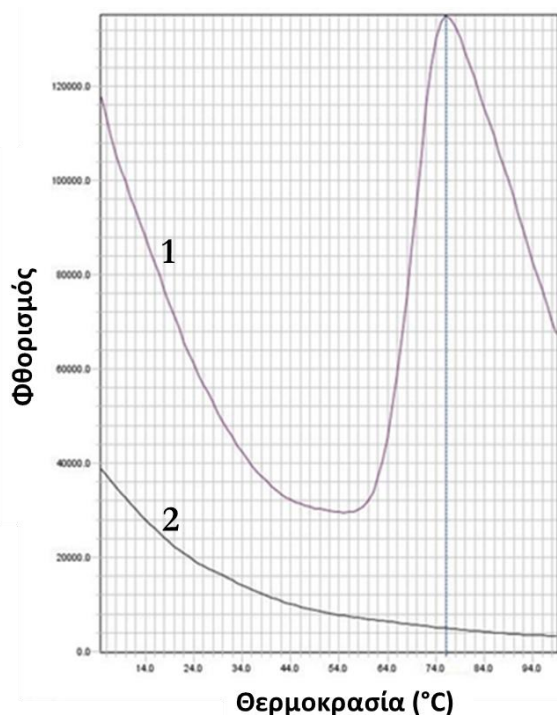
Πίνακας 4.11: Τιμές T_m για τα φυτικά ένζυμα.

| Ένζυμο | T_m (°C) |
|--------------------|----------------|
| GmGSTU8-8 | $75,3 \pm 0,8$ |
| PvGSTU2-2 | $81 \pm 1,5$ |
| PvGSTU2-2.1 | $71,5 \pm 0,2$ |

4.3.8 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων *GmGSTU8-8* και *PvGSTU2-2.1* με DSF

Η θερμική σταθερότητα των ενζύμων *GmGSTU8-8* και *PvGSTU2-2.1* αξιολογήθηκε και με βιοφυσική μέθοδο, τη DSF. Τα αποτελέσματα από αυτή τη μέθοδο συμφωνούν με τις τιμές T_m που παρουσιάζονται στη Παράγραφο 4.3.7.

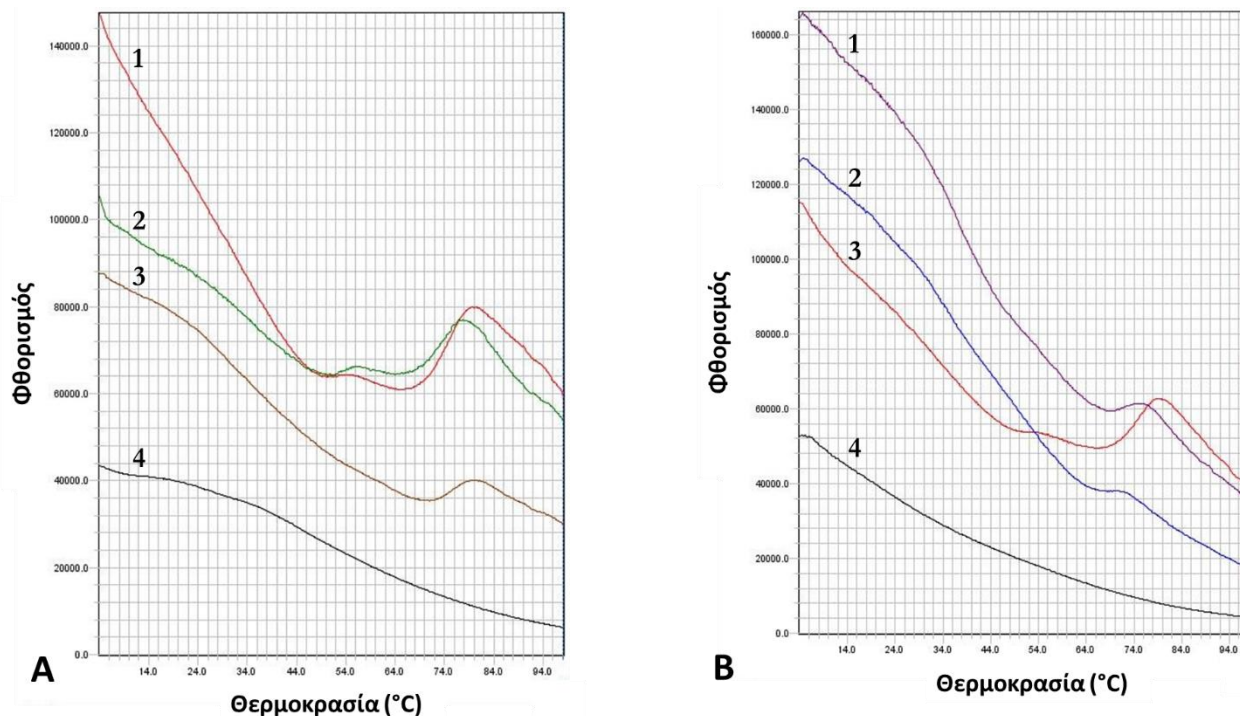
Σχετικά με το ένζυμο *GmGSTU8-8*, η καμπύλη που προέκυψε από το DSF εμφανίζει μια απλή μετάπτωση με ασύμμετρη κορυφή με μέγιστη ένταση φθορισμού στους 76°C (Εικόνα 4.12). Το *GmGSTU8-8* εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη θερμική σταθερότητα, κάτι που δεν έχει φανεί σε άλλα ένζυμα GSTs του φυτού σόγια ([Pouliou et al., 2017](#); [Skopelitou et al., 2015](#)).



Εικόνα 4.12: Καμπύλη θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου *GmGSTU8-8* με τη μέθοδο DSF. (1) 1,56 μg πρωτεΐνης και (2) μάρτυρας (απουσία ενζύμου).

Αναφορικά με το ένζυμο *PvGSTU2-2.1*, μελετήθηκε η θερμική του σταθερότητα απουσία και παρουσία διάφορων μορίων που προσδέονται σε αυτό. Παρόλο που έρευνες έχουν

δείξει ότι συνήθως η πρόσδεση μορίων στην πρωτεΐνη αυξάνουν την σταθερότητα της και συνεπώς την θερμοκρασία T_m (Niesen *et al.*, 2007), στην περίπτωση του ενζύμου PnGSTU2-2.1 δε φάνηκε να συμβαίνει κάτι τέτοιο με καμία από τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13: Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου PnGSTU2-2.1 με τη μέθοδο DSF (A) παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης GSH και S-εξυλ-GSH (1) 12,6 μg πρωτεΐνης, (2) [GSH]: 34 μM, (3) [S-εξυλ-GSH]: 34 μM, (4) μάρτυρας (απουσία ενζύμου) και (B) παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης teflubenzuron (1) [Teflubenzuron]: 40 μM, (2) [Teflubenzuron]: 80 μM, (3) 12,6 μg πρωτεΐνης, (4) μάρτυρας (απουσία ενζύμου).

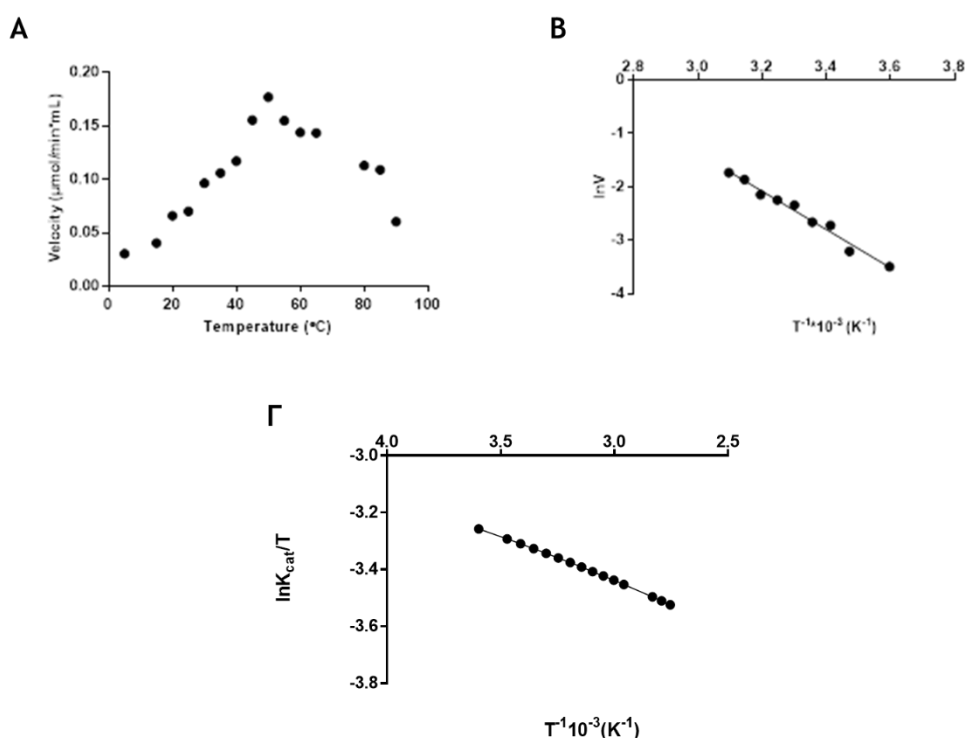
Σύμφωνα με την Εικόνα 4.13A, η παρουσία GSH μετατοπίζει την τιμή T_m προς τα αριστερά, δηλαδή προκαλεί μείωση. Από την άλλη, η S-εξυλ-GSH φαίνεται να προκαλεί απόσβεση του φθορισμού. Όσον αφορά στην παρουσία της φυτοπροστατευτικής ένωσης teflubenzuron, αύξηση της συγκέντρωσής του, προκαλεί αύξηση στην απόσβεση του φθορισμού σε σχέση με τον φθορισμό που υπάρχει στην καμπύλη θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου (Εικόνα 4.13B).

4.3.9 Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην δραστηριότητα του ενζύμου GmGSTU8-8

Η θερμοκρασία και το pH είναι δυο παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την δραστηριότητα των ενζύμων, αφού επιδρούν στην σταθερότητα τους και στην καταλυτική τους λειτουργία. Η μελέτη της επίδρασης των δυο αυτών παραγόντων στην δραστηριότητα

του ενζύμου *GmGSTU8-8* έδωσε αρκετές πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό της κατάλυσης.

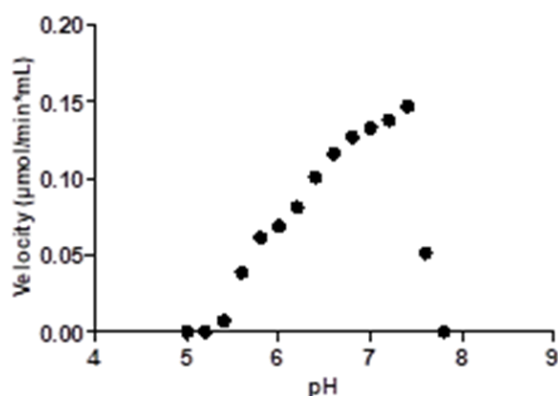
Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της θερμοκρασίας δείχνουν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία στους 50°C. Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης, τα δεδομένα της ενζυμικής δραστηριότητας προσαρμόστηκαν στην εξίσωση του Arrhenius. Στην Εικόνα 4.14, φαίνονται τα διαγράμματα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα αντίδρασης του ενζύμου.



Εικόνα 4.14: Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα κατάλυσης της αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU8-8* (A), προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Arrhenius (B), προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Eyring (Γ).

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 4.14B) και την εξίσωση του Arrhenius, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης ($E_a = 29,7 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$). Τέλος, σύμφωνα με την εξίσωση του Eyring υπολογίστηκαν η μεταβολή της ενθαλπίας ($\Delta H = -2239,456 \text{ KJmol}^{-1}$) καθώς και η μεταβολή της εντροπίας ($\Delta S = 341,6 \text{ KJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

Η μελέτη της επίδρασης του pH στην ταχύτητα κατάλυσης της αντίδρασης έδειξε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει στενό βέλτιστο pH στο 7,4, το οποίο συνοδεύεται από απότομη πτώση της ταχύτητας σε υψηλότερες τιμές pH (Εικόνα 4.15).

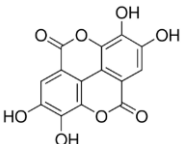
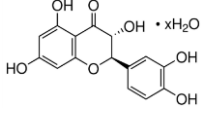
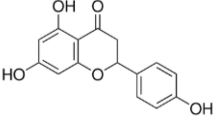


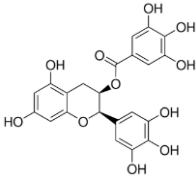
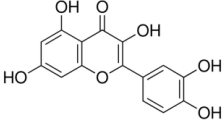
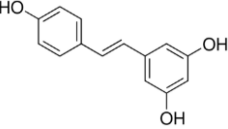
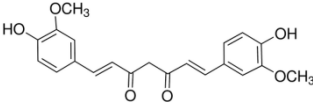
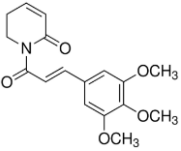
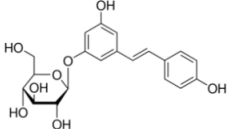
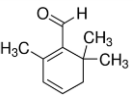
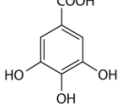
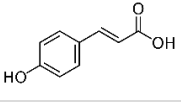
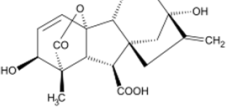
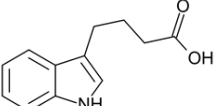
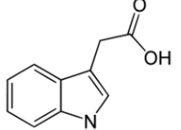
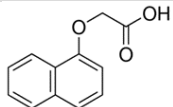
Εικόνα 4.15: Εξάρτηση της ταχύτητας κατάλυσης της αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU8-8* από το pH.

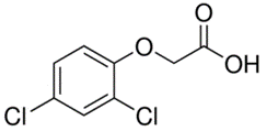
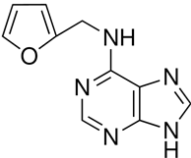
4.3.10 Σάρωση φυσικών προϊόντων ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου *GmGSTU8-8*

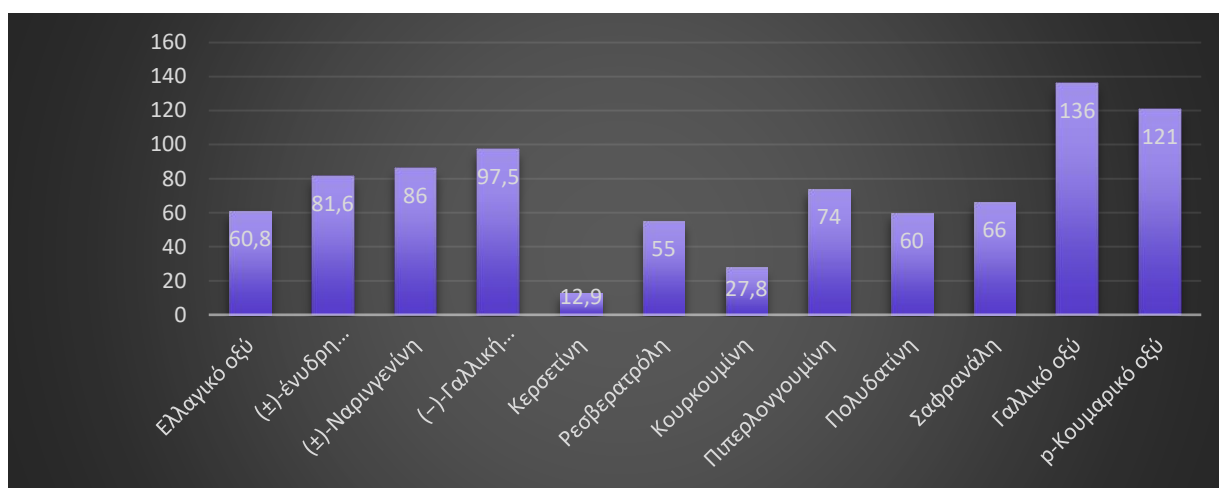
Προκειμένου να ερευνηθεί η L-θέση του ενζύμου, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση διάφορων φυσικών προϊόντων με το συγκεκριμένο ένζυμο. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία των ενώσεων αυτών. Η δέσμευση τους στην L-θέση προκαλεί μεταβολή της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου (Labrou *et al.*, 2015). Στον Πίνακα 4.12, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σάρωσης και στην Εικόνα 4.16, αναπαρίστανται γραφικά.

Πίνακας 4.12: Ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου *GmGSTU8-8* παρουσία των φυσικών προϊόντων.

| Ένωση | Δομή | Ενζυμική Δραστηριότητα (%) |
|-----------------------|---|----------------------------|
| Ελλαγικό οξύ |  | 60,8 |
| (±)-ένυδρη Ταξιφολίνη |  | 81,6 |
| (±)-Ναρινγενίνη |  | 86 |

| | | |
|---|---|------|
| (-)-Γαλλική Επιγαλοκατεχίνη |  | 97,5 |
| Κερσετίνη |  | 12,9 |
| Ρεσβερατρόλη |  | 55 |
| Κουρκουμίνη |  | 27,8 |
| Πιπερλονγουμίνη |  | 74 |
| Πολυδατίνη |  | 60 |
| Σαφρανάλη |  | 66 |
| Γαλλικό οξύ |  | 136 |
| p-Κουμαρικό οξύ |  | 121 |
| Γιβεριλικό οξύ |  | 112 |
| Ίνδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA) |  | 121 |
| Ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA) |  | 132 |
| β-ναφθοξυοξικό οξύ (BNOA) |  | 114 |

| | | |
|------------------------------------|---|-----|
| 2,4- διχλωροφαινοξυοξικό οξύ |  | 108 |
| Κινετίνη |  | 116 |



Εικόνα 4.16: Διάγραμμα ενζυμικής δραστηριότητας (%) του ενζύμου *GmGSTU8-8* έναντι 12 φυσικών προϊόντων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η κερσετίνη και η κουρκουμίνη εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας με 12,9 % και 27,8 % παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα αντίστοιχα. Είναι άλλωστε ευρέως γνωστό ότι τα φλαβονοειδή δεσμεύονται σε πολλές πρωτεΐνες, μειώνοντας σε πολλές περιπτώσεις την δραστηριότητά τους (Dangles & Dufour, 2006). Όσον αφορά στις φυτικές ορμόνες, καθώς και στο γαλλικό οξύ και p-κουμαρικό οξύ, φαίνεται να προκαλούν αύξηση της καταλυτικής λειτουργίας του ενζύμου. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ισόενζυμα των GSTs (Dixon & Edwards, 2010).

4.3.11 Σάρωση αναλόγων της GSH ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου *GmGSTU8-8*

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η αναστολή του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε μελέτη αναλόγων της GSH που δεσμεύονται στην G-θέση, θέση πρόσδεσης της GSH.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.13, καμία από τις τέσσερις ενώσεις δεν εμφάνισε ιδιαίτερα μεγάλη αναστολή στην δραστηριότητα του ενζύμου. Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει ότι οι υπό μελέτη ενώσεις δε δύνανται να αναστείλουν την πρόσδεση της GSH στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Πίνακας 4.13: Ανάλογα της GSH ως πιθανοί αναστολείς του ενζύμου *GmGSTU8-8* και η παραμένουσα δραστικότητα (%).

| Ένωση | Παραμένουσα Δραστικότητα (%) |
|---------------------------------|------------------------------|
| S-(4-νιτροβένζυλ)-GSH | 57,9 |
| S-έξυλ-L-GSH | 65 |
| Γλουταθειοσουλφονικό οξύ | 87,3 |
| S-μέθυλ-GSH | 119 |

4.3.12 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10*

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αλληλεπίδραση των ενζύμων *PvGSTU2-2.1* και *PvGSTU2-2.10* έναντι φυτοπροστατευτικών ενώσεων (Πίνακας 4.14), μετρήθηκε η ενζυμική δραστικότητα πριν και μετά την προσθήκη της κάθε ένωσης. Στον Πίνακα 4.14 και στην Εικόνα 4.17, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συγκριτικά και για τα δυο ισοένζυμα.

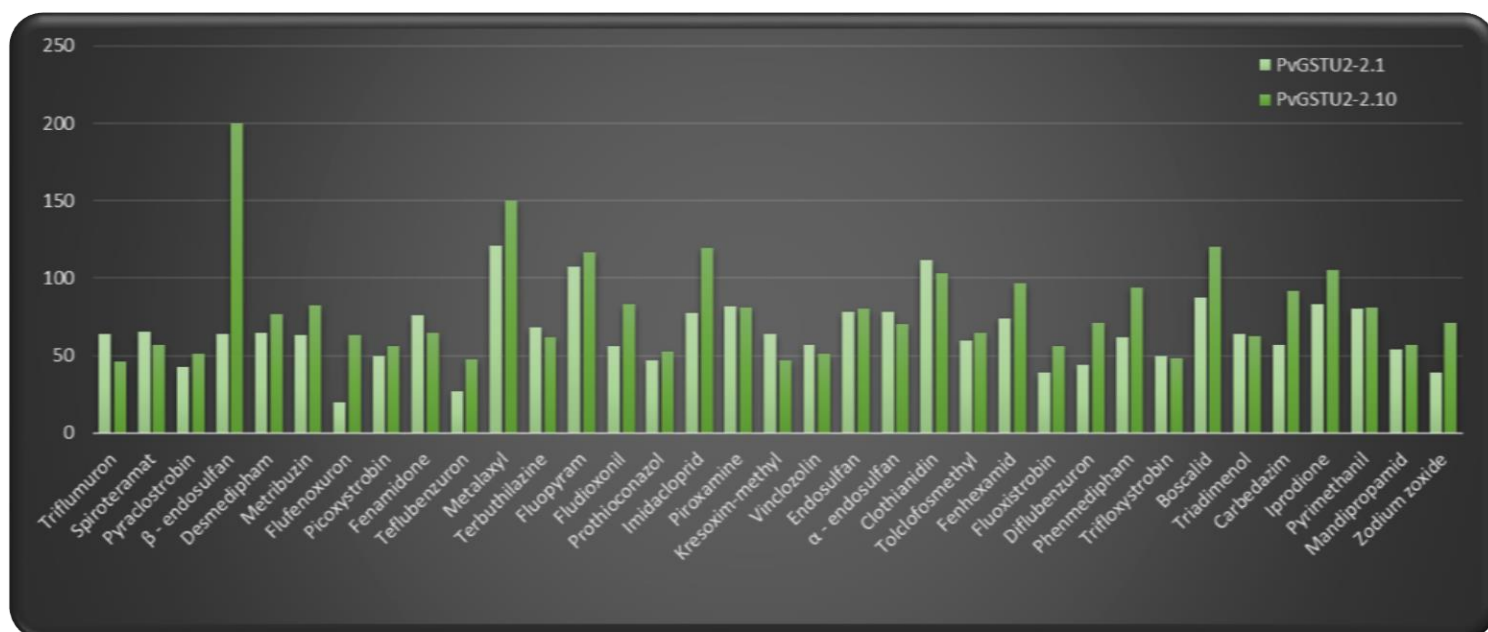
Πίνακας 4.14: Η παραμένουσα ενζυμική δραστικότητα έναντι των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

| Κατηγορία Ένωσης | Φυτοπροστατευτική Ένωση | Παραμένουσα Δραστικότητα (%) | |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|
| | | <i>PvGSTU2-2.1</i> | <i>PvGSTU2-2.10</i> |
| Φαινυλακυλουρίες | Triflumuron | 64,3 | 46,4 |
| | Teflubenzuron | 27 | 47,7 |
| | Diflubenzuron | 43,8 | 71,2 |
| | Flufenoxuron | 20 | 63,6 |
| Εστέρας τετρωνικού οξέος | Spiroteramat | 65,4 | 56,7 |
| | Pyraclostrobin | 42,3 | 50,8 |

| | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|
| | Picoxystrobin | 50 | 55,9 |
| | Fenamidone | 76,2 | 64,4 |
| | Kresoxim-methyl | 63,8 | 46,6 |
| Στρομπιλουρίνες | Fluoxystrobin | 39 | 55,9 |
| | Trifloxystrobin | 50 | 48,3 |
| | β – endosulfan | 63,8 | 200 |
| | Endosulfan | 78,5 | 80,2 |
| Οργανοχλωριωμένα | α – endosulfan | 78,5 | 70,4 |
| | Desmedipham | 64,6 | 77 |
| Διφαινυλικοί αιθέρες | Phenmedipham | 61,5 | 94 |
| | Metribuzin | 63,1 | 82,7 |
| Τριαζίνες | Terbuthilazine | 68,5 | 61,9 |
| | Metalaxyl | 120,7 | 150 |
| | Fenhexamid | 73,8 | 96,6 |
| Ανιλίδια | Boscalide | 87,7 | 120,4 |
| | Fluopyram | 107,6 | 117 |
| Βενζαμίδια | Zodium zoxide | 39,2 | 71,2 |
| Φαινυλοπυρρολικό | Fludioxonil | 56,2 | 82,9 |
| | Prothioconazole | 46,9 | 52,5 |
| Τριαζόλια | Triadimenol | 63,8 | 62,7 |
| | Imidacloprid | 77,7 | 119,3 |
| Νεοκοτινοειδή | Clothianidin | 111,5 | 103,4 |
| Σπυροκεταλαμίνη | Spiroxamine | 81,5 | 81,4 |
| | Vinclozolin | 56,9 | 51,5 |
| Δικαρβοξυμίδια | Iprodione | 83 | 105 |
| Οργανοφωσφορικός εστέρας | Tolclofosmethyl | 60 | 64,8 |
| Βενζιμιδαζόλιο | Carbedazim | 57 | 91,5 |
| Ανιλικό-πυριμιδίνη | Pyrimethanil | 80,7 | 81,4 |
| Αμίδιο | Mandipropamid | 53,8 | 56,7 |

Αρχικά, όλες οι ενώσεις που εμφάνισαν αναστολή των ενζύμων, έδειξαν αναστολή ανεξάρτητη από τον χρόνο, υποδεικνύοντας έτσι ότι η δέσμευση στα ένζυμα είναι αναστρέψιμη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σχετικά με το PnGSTU2-2.1, το εντομοκτόνο Teflubenzuron, το οποίο ανήκει στις φαινυλακυλουρίες, εμφανίζει υψηλή αναστολή. Επιπλέον, φυτοπροστατευτικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως είναι το endosulfan, το trifloxystrobin, το fluoxystrobin, το pyraclostrobin κ.α, φαίνεται να προκαλούν μέτρια αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου. Αντίθετα,

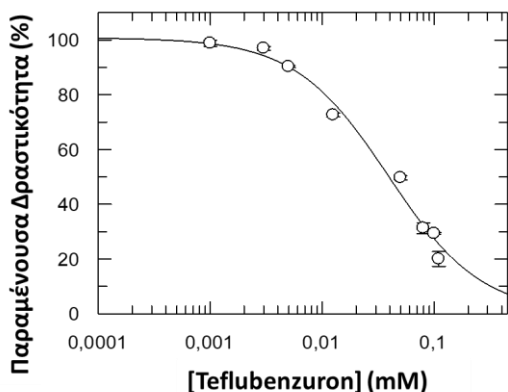
όσον αφορά στην αναστολή του ισοενζύμου PvGSTU2-2.10, οι περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις φαίνεται να επηρεάζουν την δραστικότητα του σε μέτριο βαθμό έως καθόλου, ενώ οι ενώσεις b-endosulfan, boscalide και imidachloprid αυξάνουν την δραστικότητα του ενζύμου. Τέλος, οι ενώσεις metalaxyl, fluopyram και clothianidin προκαλούν αύξηση της δραστικότητας και των δυο ενζύμων, γεγονός που έχει παρατηρηθεί ξανά στις GSTs (Chronopoulou *et al.*, 2012).



Εικόνα 4.17: Συγκριτικό διάγραμμα της παραμένουσας δραστικότητας των ενζύμων PvGSTU2-2.1 και PvGSTU2-2.10 έναντι των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

4.3.13 Υπολογισμός της τιμής IC₅₀ για την αλληλεπίδραση του PvGSTU2-2.1 με το *teflubenzuron*

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η ένωση που εμφάνισε τη μεγαλύτερη αναστολή δραστικότητας του ενζύμου μελετήθηκε περαιτέρω ώστε να βρεθεί η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση αναστολέα που επιφέρει 50 % απώλεια της ενζυμικής δραστικότητας. Στην Εικόνα 4.18, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της μελέτης.



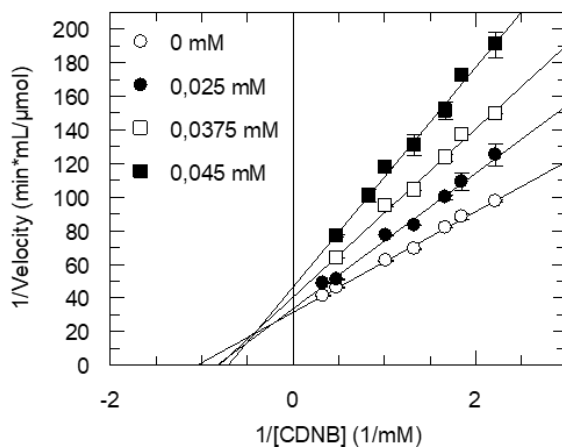
Εικόνα 4.18: Καμπύλη συγκέντρωσης-παραμένουσας δραστηκότητας για το εντομοκτόνο teflubenzuron. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH και είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων. Η τιμή IC_{50} είναι $38,8 \pm 4,8 \mu M$.

4.3.14 Κινητική μελέτη της αναστολής του teflubenzuron με το ένζυμο PnGSTU2-2.1

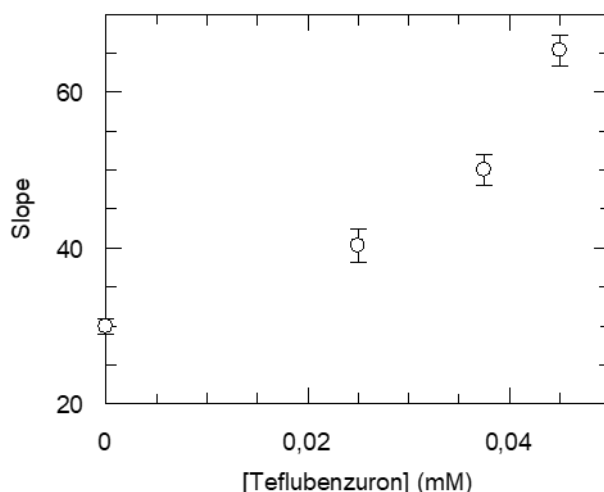
Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη κινητική μελέτη με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την ένωση που επιλέχθηκε, ακολουθώντας τις συνθήκες που περιγράφονται στη Παράγραφο 4.2.16.1.

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα (0,025 mM, 0,0375 mM και 0,045 mM), καθώς επίσης και απουσία αναστολέα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.19 και 4.20.

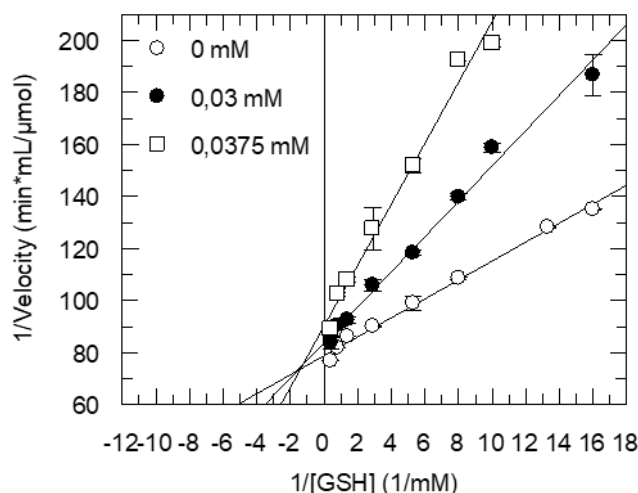


Εικόνα 4.19: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος CDNB για τρεις σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα.

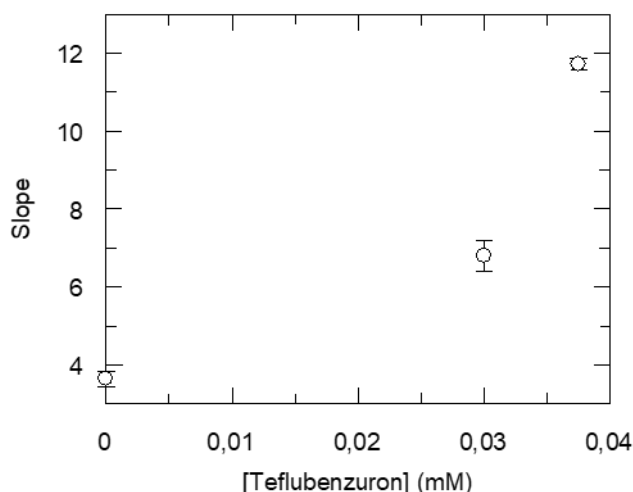


Εικόνα 4.20: Δευτερογενής γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 4.19. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσεϊ της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της αναστολής έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 4.2.16.2. Η συγκεκριμένη ένωση μελετήθηκε σε δυο διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0,03 mM και 0,0375 mM). Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα διπλα αντίστροφα (Εικόνα 4.21) καθώς επίσης και η δευτερογενής παράσταση (Εικόνα 4.22).



Εικόνα 4.21: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσεϊ της συγκέντρωσης υποστρώματος GSH για δύο σταθερές συγκεντρώσεις του αναστολέα.



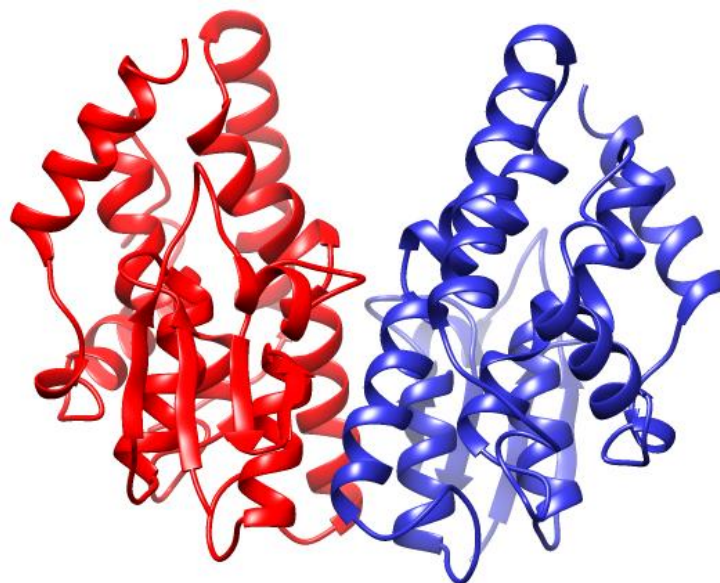
Εικόνα 4.22: Δευτερογενής γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 4.21. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Ακολούθως, υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής με τον τρόπο που περιγράφεται στη Παράγραφο 4.2.17. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όσον αφορά στον τύπο αναστολής ως προς το CDNB πρόκειται για μερικώς μικτή αναστολή, αφού το δευτερογενές γράφημα δεν είναι γραμμικό. Στη μικτή αναστολή, όπως αναφέρεται και στη Παράγραφο 4.2.17.2, υπάρχουν δυο σταθερές αναστολής, η K_i για το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα και η K_i' για το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος. Η σταθερά αναστολής K_i προσδιορίστηκε $0,02 \pm 0,0008 \mu\text{M}$, ενώ η K_i' $0,059 \pm 0,002 \mu\text{M}$.

Αναφορικά με τον τύπο αναστολής ως προς GSH, πρόκειται επίσης για μερικώς μικτή αναστολή. Η σταθερά αναστολής K_i προσδιορίστηκε $0,023 \pm 0,007 \mu\text{M}$, ενώ η K_i' $0,00014 \pm 0,00008 \mu\text{M}$.

4.3.15 Μοριακή μοντελοποίηση του ενζύμου GmGSTU8-8

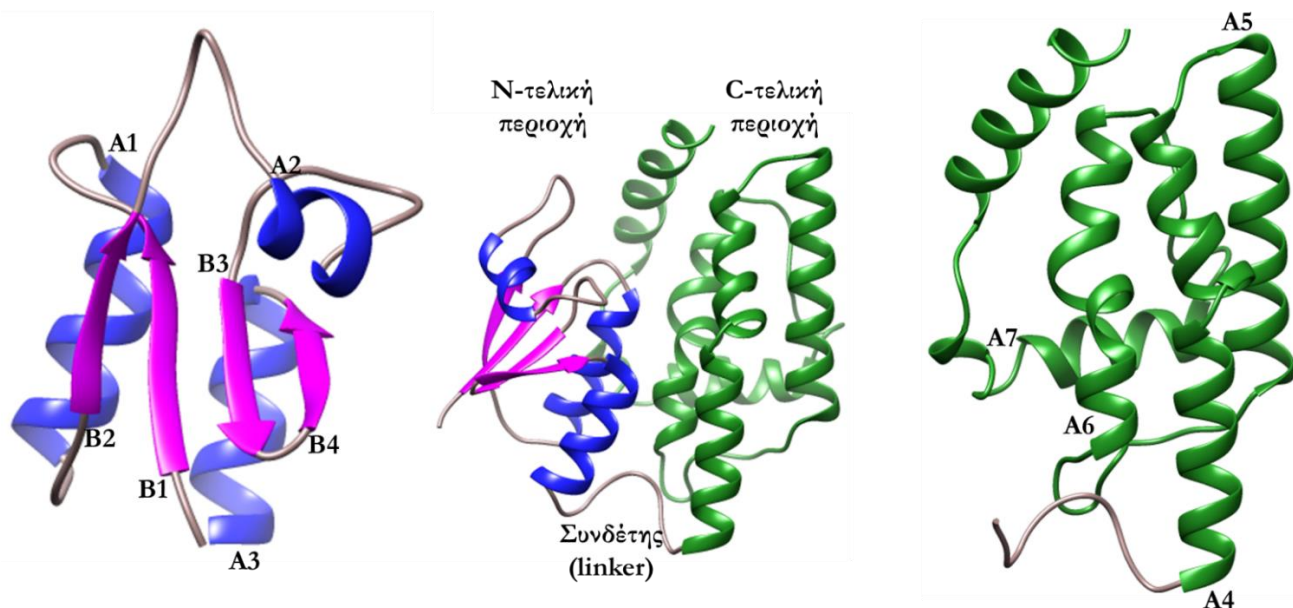
Προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα τα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου GmGSTU8-8, πραγματοποιήθηκε ομόλογη μοντελοποίηση και μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.23.



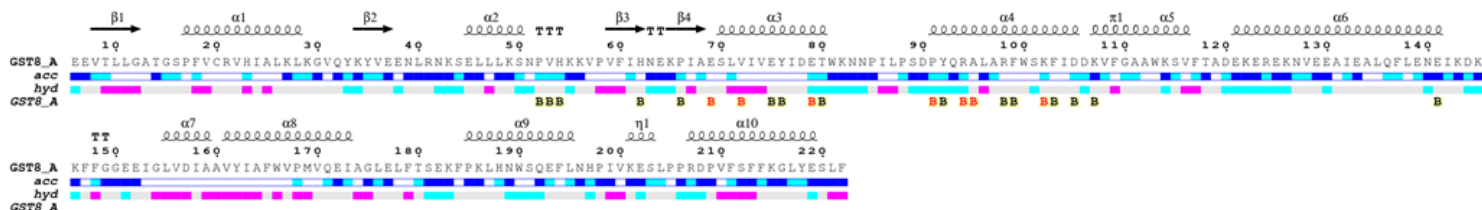
Εικόνα 4.23: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς του ενζύμου *GmGSTU8-8*. Η μια υπομονάδα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και η άλλη με μπλε. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Το ένζυμο *GmGSTU8-8* είναι ένα ομοδιμερές, το οποίο εμφανίζει την χαρακτηριστική GST αναδίπλωση. Συγκεκριμένα, αποτελείται από τη συντηρημένη N-τελική δομική ενότητα, η οποία είναι όμοια με αυτήν της θειορεδοξίνης και αποτελείται τόσο από α -έλικες (A1-A3) όσο και από β -ελάσματα (B1-B4), και από την λιγότερο συντηρημένη C-τελική δομική ενότητα, η οποία αποτελείται μόνο από α -έλικες (A4-A7) (Εικόνα 4.24). Η N-τελική περιοχή συνδέεται με την C-τελική περιοχή με ένα μικρό κομμάτι δέκα αμινοξέων (81-90), το οποίο ονομάζεται συνδέτης (linker). Πιο συγκεκριμένα, η $\alpha 1$ -έλικα αποτελείται από δώδεκα αμινοξέα (17-28), η $\alpha 2$ από έξι (45-50) και η $\alpha 3$ από έντεκα αμινοξέα (70-80). Αναφορικά με τις β -πτυχωτές, η $\beta 1$ αποτελείται από πέντε αμινοξέα (8-12) και οι άλλες τρεις β -πτυχωτές επιφάνειες από τέσσερα αμινοξέα η καθεμία (34-37, 59-62 και 65-68, αντίστοιχα). Όσον αφορά στη C-τελική περιοχή, η $\alpha 4$ -έλικα αποτελείται από τα αμινοξέα 91-105 και 107-118, η $\alpha 5$ από τα κατάλοιπα 121-141, η $\alpha 6$ από τα αμινοξέα 155-173 και τέλος, η $\alpha 7$ -έλικα από τα αμινοξέα στις θέσεις 182-195, 201-203 και 207-219. Σε κάθε υπομονάδα του διμερούς υπάρχουν δυο ανεξάρτητες περιοχές δέσμευσης υποστρώματος (ενεργό κέντρο): μια περιοχή που δεσμεύει το υπόστρωμα (G- θέση) στη N-τελική δομική ενότητα και μια περιοχή που δεσμεύονται τα υδρόφοβα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (H- θέση) στη C-τελική δομική ενότητα. Οι έλικες που σχηματίζουν την H-θέση εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία και έτσι εξηγείται και η ευρεία εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων. Ανάλυση της προσβασιμότητας και της

υδροφιλικότητας έδειξε ότι το ενεργό κέντρο του ενζύμου *GmGSTU8-8* βρίσκεται στο εσωτερικό του ενζύμου και αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξέα (Εικόνα 4.25).

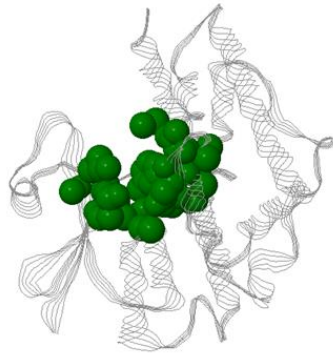


Εικόνα 4.24: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *GmGSTU8-8*. Η N-τελική περιοχή εμφανίζεται με μπλε (α-έλικες) και μωβ (β-πτυχωτές επιφάνειες) χρώμα, ενώ η C-τελική περιοχή εμφανίζεται με πράσινο χρώμα. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

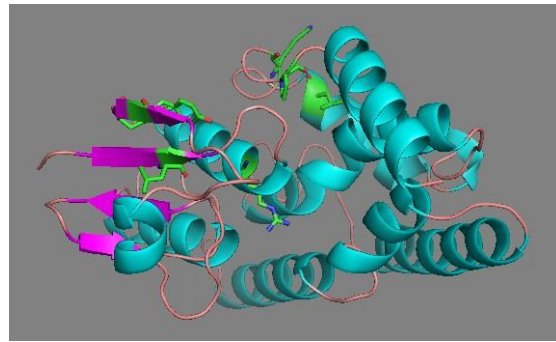


Εικόνα 4.25: Αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αλληλουχίας του ενζύμου *GmGSTU8-8* με το πρόγραμμα ENDscript (Robert & Gouet, 2014). Οι β-πτυχωτές επιφάνειες απεικονίζονται με βέλη, οι α-έλικες με έλικες και οι στροφές με τα γράμματα TT. Η προσβασιμότητα των υποστρωμάτων φαίνεται στη πρώτη γραμμή κάτω από την αλληλουχία (με μπλε χρώμα φαίνονται τα προσβάσιμα αμινοξέα, με γαλάζιο τα ενδιάμεσα και με λευκό τα μη προσβάσιμα), στην επόμενη γραμμή απεικονίζεται η υδροφοβικότητα (με ροζ χρώμα φαίνονται τα υδρόφοβα, με λευκό τα ουδέτερα και με γαλάζιο τα υδρόφιλα). Στην τελευταία γραμμή απεικονίζονται οι σχέσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-προσδέτη. Τα κόκκινα γράμματα απεικονίζουν επαφές < 3,2 Å, ενώ τα μαύρα γράμματα επαφές από 3,2 μέχρι 5 Å. Το σύμβολο ^ δείχνει τα αμινοξέα που έχουν επαφή με έναν προσδέτη.

Το ομόλογο μοντέλο αναλύθηκε με το πρόγραμμα CastP, προκειμένου να βρεθούν οι κοιλότητες πρόσδεσης (Εικόνα 4.26Α). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κάθε υπομονάδα υπάρχει μια κοιλότητα μικρή σε περιοχή (368.1 \AA^2) και όγκο (463.1 \AA^3). Η άλλη κοιλότητα που βρέθηκε ήταν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και πολλή μικρότερη από την πρώτη (περιοχή: 232.9 \AA^2 και όγκος: 322.6 \AA^3).



A



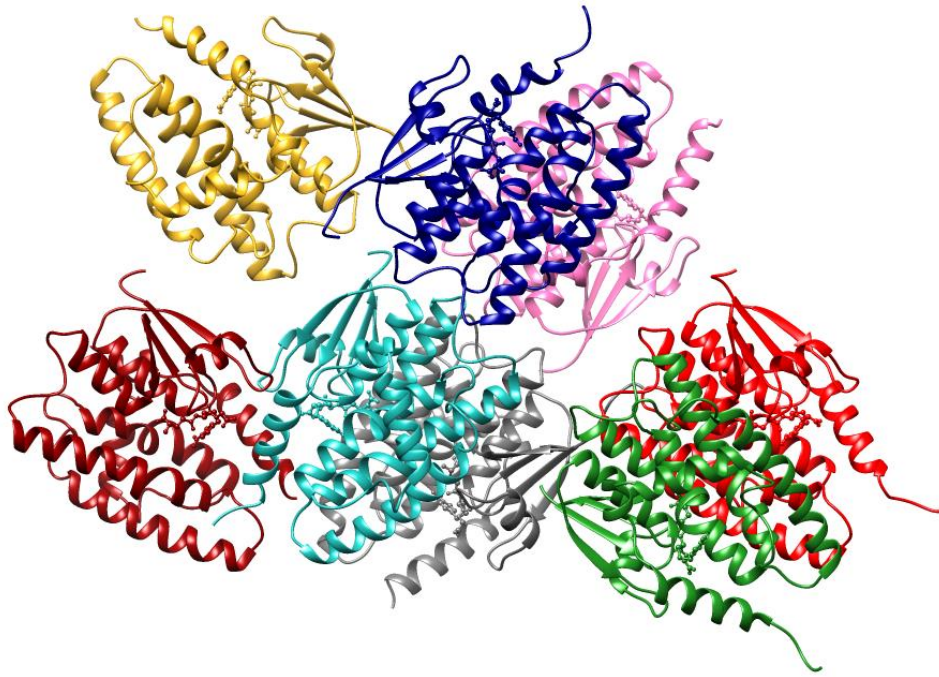
B

Εικόνα 4.26: Απεικόνιση της L-θέσης με τη χρήση του προγράμματος CastP (A) και του PyMOL (B). Τα αμινοξέα που σχηματίζουν την L-θέση παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα.

4.3.16 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου *PnGSTU2-2.1* σε σύμπλοκο με την *S-p*-νιτροβένζυλο-GSH (GTB)

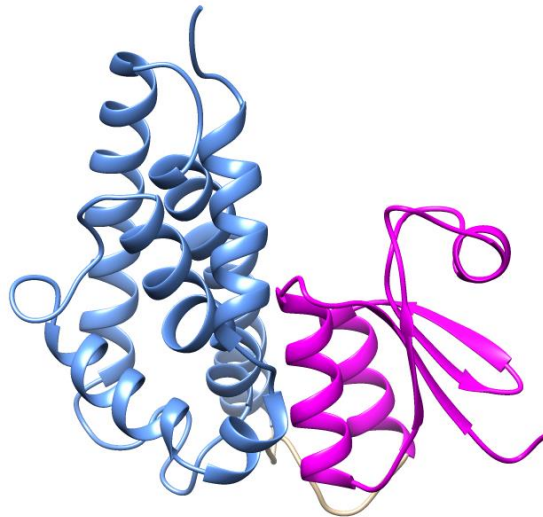
Πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφία ακτίνων X για την επίλυση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου, προκειμένου να κατανοηθούν πληρέστερα οι λειτουργίες του. Ο προσδιορισμός της δομής του καθαρού ενζύμου *PnGSTU2-2.1* με την *S-p*-νιτροβένζυλο-GSH έγινε μέσω κρυσταλλογραφίας περίθλασης ακτίνων X. Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Βιοτεχνολογίας Τούρκου στη Φινλανδία από την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου, με τη μέθοδο εξάτμισης της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop vapor diffusion method).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.27, το ένζυμο κρυσταλλώνεται ως οκταμερές από τέσσερα ομοδιμερή. Σε κάθε υπομονάδα προσδέεται ένα μόριο *S-p*-νιτροβένζυλο-GSH. Πρόκειται για ένα μόριο που είναι ανάλογο υποστρώματος-προϊόντος.



Εικόνα 4.27: Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *PnGSTU2-2.1*. Κάθε υπομονάδα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως ράβδος. Η εικόνα σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Το κάθε μονομερές αποτελείται από 225 αμινοξέα. Σε κάθε ένα μονομερές, υπάρχουν δυο δομικές περιοχές, η N-τελική περιοχή (αμινοξέα 9-81) με τοπολογία α/β (βαβαββα) και η C-τελική περιοχή (αμινοξέα 91-217).



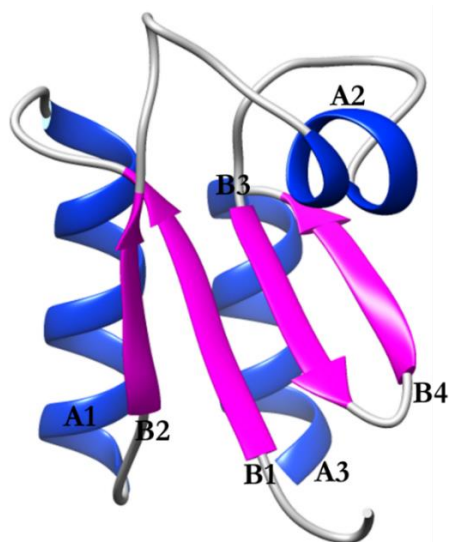
Εικόνα 4.28: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *PnGSTU2-2.1*. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η C-τελική περιοχή, ενώ με μωβ η N-τελική περιοχή.

4.3.16.1 N-τελική περιοχή

Η N-τελική περιοχή αποτελείται από τρεις α-έλικες, μεσαίου μήκους και τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες. Η α1-έλικα αποτελείται από δεκατρία αμινοξέα (κατάλοιπα 17-29), η α2-έλικα είναι η μικρότερη και αποτελείται από έξι αμινοξέα (κατάλοιπα 45-50) και η α3 αποτελείται από έντεκα αμινοξέα (κατάλοιπα 70-80). Όσον αφορά στις β-πτυχωτές επιφάνειες, πρόκειται για μικρού μήκους ενότητες. Πιο συγκεκριμένα, η β1 αποτελείται από πέντε αμινοξέα (κατάλοιπα 8-12), ενώ η β2, η β3 και η β4 αποτελούνται από τέσσερα αμινοξέα η καθεμία (β2: κατάλοιπα 34-37, β3: 59-62 και β4: 65-68). Η β3-πτυχωτή επιφάνεια προσανατολίζεται αντιπαράλληλα με τις υπόλοιπες πτυχωτές επιφάνειες (Εικόνα 4.29).

Οι α-έλικες και οι β-πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μεγεθών, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυνητικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενους β-κλώνους ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και το μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β-φουρκέτας.

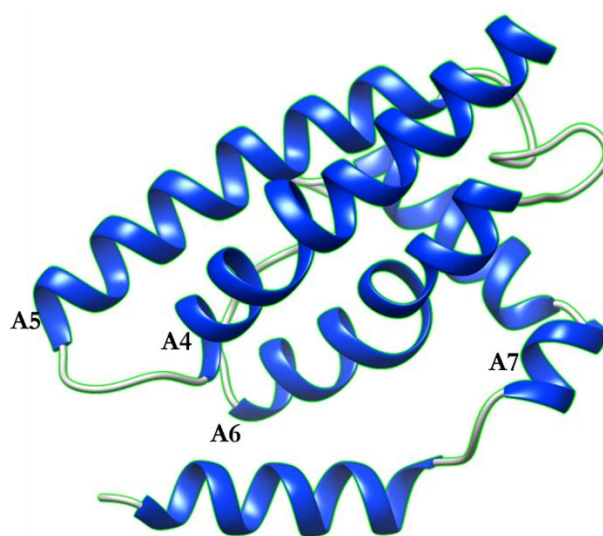
Η β1-πτυχωτή επιφάνεια με την α1-έλικα καθώς επίσης και η α1-έλικα με την β2-πτυχωτή επιφάνεια συνδέονται με μικρούς βρόγχους τεσσάρων αμινοξέων. Η β2-πτυχωτή επιφάνεια συνδέεται με την α2-έλικα με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο επτά καταλοίπων. Η α2-έλικα με την β3-πτυχωτή επιφάνεια συνδέονται με ένα βρόγχο οκτώ καταλοίπων. Η σύνδεση των κλώνων β3 και β4 εμφανίζει το μοτίβο β-φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, η πτυχωτή επιφάνεια β4 ενώνεται με την α3-έλικα με ένα μόνο κατάλοιπο.



Εικόνα 4.29: Τρισδιάστατη δομή της N-τελικής περιοχής του ενζύμου PnGSTU2-2.1. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι α-έλικες, ενώ με μωβ παρουσιάζονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες.

4.3.16.2 C-τελική περιοχή

Η C-τελική περιοχή είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή. Αποτελείται από τα κατάλοιπα 91 έως 220 και συγκεκριμένα από τέσσερις α -έλικες (Εικόνα 4.30). Η $\alpha 4$ -έλικα αποτελείται από είκοσι έξι αμινοξέα (κατάλοιπα 91-116). Η $\alpha 5$ -έλικα αποτελείται από είκοσι δύο αμινοξέα (κατάλοιπα 121-142) Η $\alpha 6$ -έλικα αποτελείται από δεκαεννιά αμινοξέα (κατάλοιπα 155-173) και τέλος η $\alpha 7$ -έλικα αποτελείται από τριάντα δύο αμινοξέα (κατάλοιπα 185-196, 198-203 και 207-220). Η $\alpha 4$ -έλικα και η $\alpha 5$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα μικρό βρόγχο μόνο τεσσάρων καταλοίπων (117-120). Η $\alpha 5$ -έλικα με την $\alpha 6$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα σύνδεσμο δώδεκα καταλοίπων (143-154) και τέλος η $\alpha 6$ -έλικα ενώνεται με την $\alpha 7$ -έλικα μέσω έντεκα καταλοίπων (174-184).



Εικόνα 4.30: Τρισδιάστατη δομή της C-τελικής περιοχής του ενζύμου PnGSTU2-2.1. Οι α -έλικες αναπαρίστανται με μπλε χρώμα.

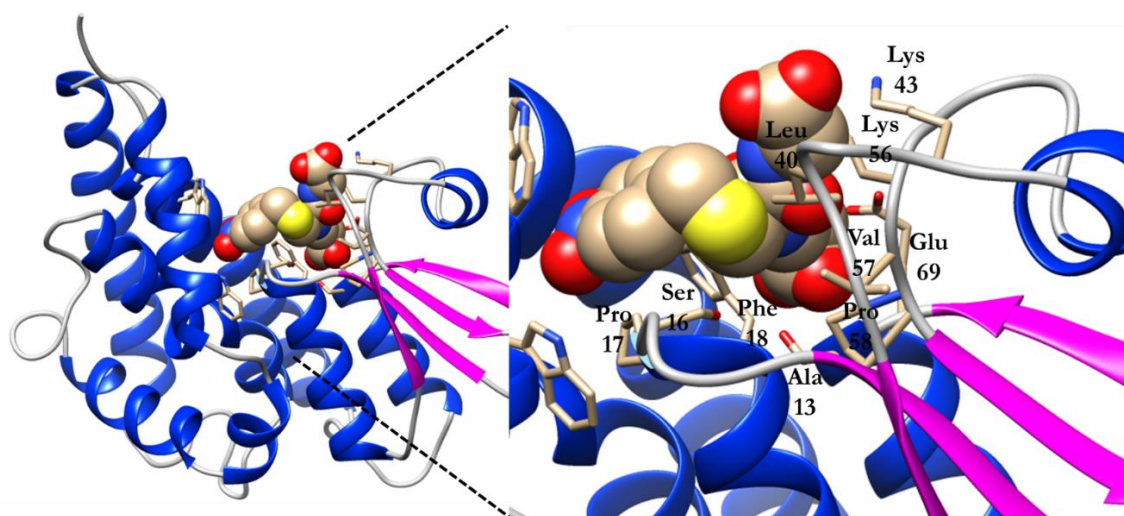
4.3.16.3 G-θέση

Η G-θέση βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και αποτελείται από αμινοξέα στη περιοχή 16-70. Η G-θέση είναι το σημείο πρόσδεσης της GSH. Σε κάθε μονομερές προσδένεται ένα μόριο GSH. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα σχεδόν σε όλες τις GSTs (Chronopoulou *et al.*, 2017). Στο συγκεκριμένο πείραμα, το καθαρό ένζυμο κρυσταλλώθηκε σε σύμπλοκο με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH (Εικόνα 4.31).

Για την αναγνώριση του γ -γλουταμυλ-τμήματος της S-p-νιτροβένζυλο-GSH είναι υπεύθυνο το μοτίβο $\beta\beta$ και αποτελεί τη πιο καλά συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλες τις GSTs (Armstrong, 1997).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.31, τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν κυρίως με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH είναι δεκατρία (Πίνακας 4.15). Τα αμινοξέα αλανίνη (Ala13) και

σερίνη (Ser16), το οποίο είναι το καταλυτικό αμινοξύ, βρίσκονται στον βρόγχο που ενώνει την β1-πτυχωτή επιφάνεια με την α1-έλικα. Τα αμινοξέα προλίνη (Pro17) και φαινυλαλανίνη (Phe18) βρίσκονται στην α1-έλικα. Η λευκίνη (Leu40) και η λυσίνη (Lys43) βρίσκονται στον βρόγχο που συνδέει την β2-πτυχωτή επιφάνεια με την α3-έλικα. Τα αμινοξέα λυσίνη (Lys56), βαλίνη (Val57) και προλίνη (Pro58) βρίσκονται στον βρόγχο που συνδέει την α2-έλικα με την β3-πτυχωτή επιφάνεια. Το αμινοξύ Pro58 είναι το χαρακτηριστικό αμινοξύ της αναδίπλωσης της θειορεδοξίνης, το οποίο ενώνει την α2-έλικα με την β3-πτυχωτή επιφάνεια και έχει φανεί να εμπλέκεται στην πρόσδεση του υποστρώματος (Pedone *et al.*, 2010). Τέλος, το γλουταμινικό οξύ (Glu69) είναι το πρώτο αμινοξύ του βρόγχου που συνδέει την β4-πτυχωτή επιφάνεια με την α3-έλικα.



Εικόνα 4.31: Τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH και των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες, ενώ τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν φαίνονται ως ράβδοι, με χρώματα ανάλογα με τον ατομικό τύπο.

Πίνακας 4.15: Αποστάσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου PnGSTU2-2.1 και της S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vriend, 1990).

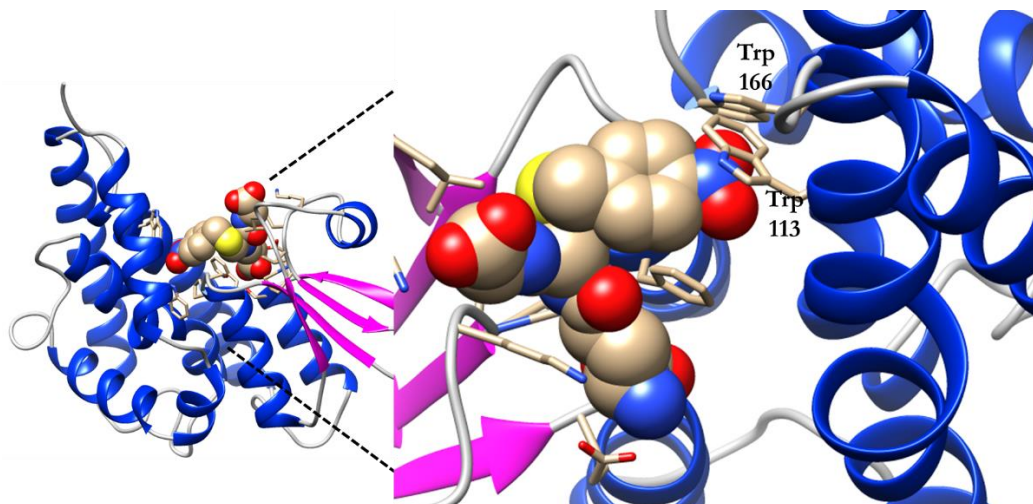
| Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) | Απόσταση (Å) | S-p-νιτροβένζυλο-GSH (άτομο) | Τύπος αλληλεπίδρασης |
|--|--------------|------------------------------|----------------------|
| SER16 (CB) | 3,66 | CB2 | C[]...C[] |
| SER16 (CB) | 3,94 | SG2 | C[]...S[] |
| PRO17 (CD) | 3,38 | O42 | C[]...O[] |
| PRO17 (CD) | 3,78 | C3 | C[]...C[] |
| PRO17 (CD) | 3,82 | C4 | C[]...C[] |
| PRO17 (CD) | 3,65 | N41 | C[]...N[] |
| PHE18 (CG) | 3,66 | CG1 | C[]...C[] |

| | | | |
|--------------|------|-----|-----------|
| PHE18 (CD2) | 3,34 | CD1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CD2) | 3,77 | CB1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CD2) | 3,33 | CG1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CE2) | 3,61 | CD1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CE2) | 3,83 | CB1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CE2) | 3,81 | CG1 | C[]...C[] |
| PHE18 (CE2) | 3,76 | C5 | C[]...C[] |
| LEU40 (CD1) | 3,69 | CA3 | C[]...C[] |
| LEU40 (CD1) | 3,83 | C2 | C[]...C[] |
| LEU40 (CD1) | 3,29 | SG2 | C[]...S[] |
| LYS43 (CE) | 3,23 | O32 | C[]...O[] |
| LYS43 (NZ) | 2,82 | O32 | N[]...O[] |
| LYS56 (CA) | 3,34 | O2 | C[]...O[] |
| LYS56 (CD) | 3,81 | CD1 | C[]...C[] |
| VAL57 (N) | 2,86 | O2 | N[]...O[] |
| VAL57 (O) | 2,75 | N2 | O[]...N[] |
| VAL57 (O) | 3,22 | CG1 | O[]...C[] |
| VAL57 (CG2) | 3,21 | O2 | C[]...O[] |
| PRO58 (CD) | 3,29 | O12 | C[]...O[] |
| GLU69 (CD) | 3,39 | N1 | C[]...N[] |
| GLU69 (CD) | 3,71 | CA1 | C[]...C[] |
| GLU69 (OE1) | 2,67 | N1 | O[]...N[] |
| GLU69 (OE1) | 3,40 | CA1 | O[]...C[] |
| GLU69 (OE2) | 3,44 | CA1 | O[]...C[] |
| SER70 (N) | 2,93 | O12 | N[]...O[] |
| SER70 (N) | 3,38 | C1 | N[]...C[] |
| SER70 (N) | 3,29 | O11 | N[]...O[] |
| SER70 (OG) | 3,32 | C1 | O[]...C[] |
| SER70 (OG) | 2,52 | O11 | O[]...O[] |
| TRP113 (CZ3) | 3,17 | O42 | C[]...O[] |
| TRP113 (CZ3) | 3,48 | N41 | C[]...N[] |
| TRP166 (CD1) | 3,36 | O42 | C[]...O[] |
| PHE214 (CZ) | 3,85 | C2 | C[]...C[] |
| PHE214 (CZ) | 3,63 | C3 | C[]...C[] |

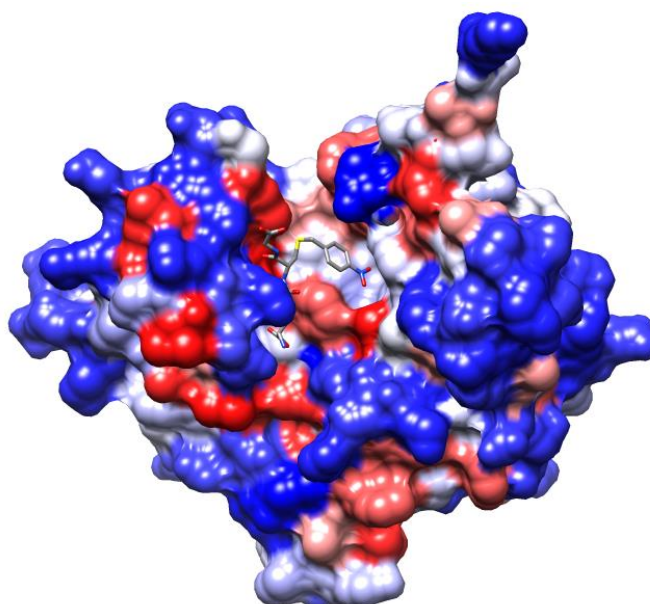
4.3.16.4 Η-θέση

Η Η-θέση βρίσκεται στην C-τελική περιοχή, δίπλα από την G-θέση και αποτελεί θέση δέσμευσης των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Αποτελείται από τα αμινοξέα 105-217, τα οποία είναι κυρίως υδρόφοβα. Οι πλευρικές αλυσίδες αυτών των αμινοξέων χρησιμοποιούνται ως δότες σε δεσμούς υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Κάποια από τα υδρόφοβα κατάλοιπα της Η-θέσης είναι οι τρυπτοφάνες (Trp113 και Trp166), εκ των

οποίων η πρώτη βρίσκεται στην α 4-έλικα και η δεύτερη στην α 6. Η ικανότητα δέσμευσης μιας ποικιλίας υποστρωμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι τα αμινοξέα της συγκεκριμένης περιοχής δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα (Hayes *et al.*, 2005). Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αποτελεί ανάλογο υποστρώματος-προϊόντος και όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.32, το νιτροβένζυλο τμήμα της ένωσης είναι δεσμευμένο σε μια υδρόφοβη σχισμή που αποτελείται κυρίως από τα αμινοξέα Trp113 και Trp166 (Εικόνα 4.33).



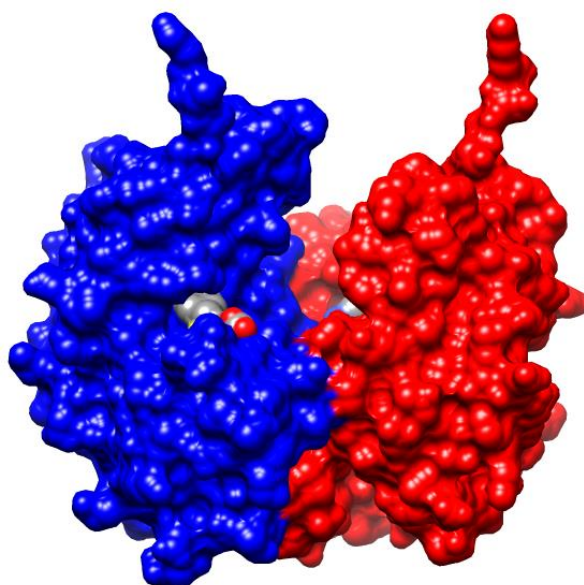
Εικόνα 4.32: Τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH και των αμινοξέων της C-τελικής περιοχής που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες, ενώ τα αμινοξέα που την συγκρατούν φαίνονται ως ράβδοι, με χρώματα ανάλογα με τον ατομικό τύπο.



Εικόνα 4.33: Τρισδιάστατη δομή της μιας υπομονάδας του ενζύμου PnGSTU2-2.1 και της S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως ράβδοι με χρώματα ανάλογα με τον ατομικό τύπο. Το ένζυμο αναπαρίσταται ως σφαίρες με χρώματα ανάλογα με την υδροφοβικότητα των αμινοξέων.

4.3.16.5 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 μπορεί να είναι γέφυρες άλατος, δεσμοί υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Hegazy *et al.*, 2004; Vargo *et al.*, 2004; Sayer *et al.*, 2000). Οι γέφυρες άλατος, που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρώτης υπομονάδας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.16.

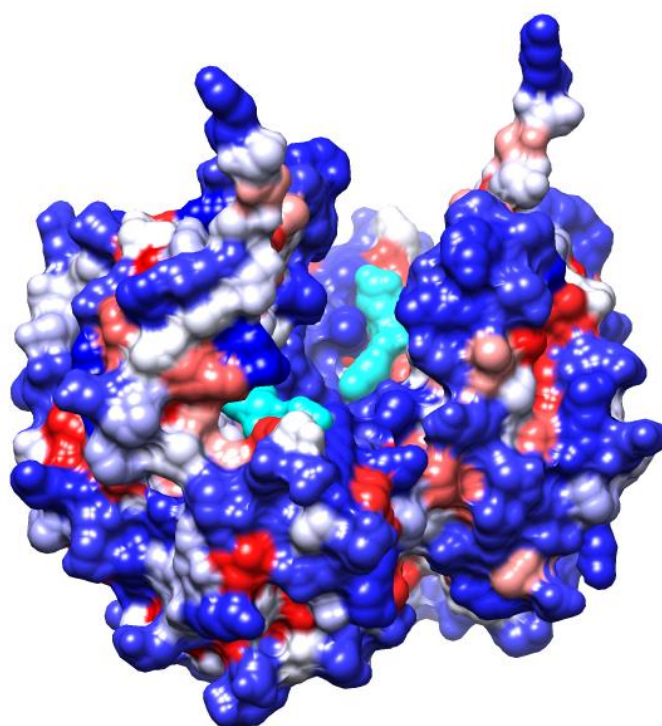


Εικόνα 4.34: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς με τη μορφή σφαιρών του ενζύμου PnGSTU2-2.1. Η μια υπομονάδα φαίνεται με κόκκινο χρώμα, ενώ η άλλη με μπλε. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH απεικονίζεται με χρώματα ανάλογα του ατομικού τύπου.

Πίνακας 4.16: Γέφυρες άλατος μεταξύ των καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου PnGSTU2-2.1. Ως μέγιστο όριο έως του οποίου παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκε η απόσταση 4 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vriend, 1990).

| Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) | Απόσταση (Å) | Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) |
|--|--------------|--|
| ASP7 (OD1) | 3,92 | ASN4 (N) |
| ASP7 (OD2) | 2,42 | ASN4 (N) |
| GLU69 (OE2) | 3,77 | HIS54 (NE2) |
| GLU75 (OE1) | 2,94 | ARG98 (NH2) |
| GLU75 (OE1) | 3,26 | ARG98 (NE) |
| GLU75 (OE2) | 3,18 | ARG98 (NE) |
| ASP78 (OD1) | 2,79 | LYS29 (NZ) |
| ASP105 (OD1) | 3,17 | ARG21 (NH1) |
| ASP105 (OD1) | 2,65 | ARG21 (NH2) |

| | | |
|--------------|------|--------------|
| ASP105 (OD2) | 3,21 | ARG21 (NH1) |
| ASP105 (OD2) | 3,83 | ARG21 (NH2) |
| ASP106 (OD2) | 2,71 | LYS102 (NZ) |
| GLU121 (OE1) | 2,38 | ARG124 (NH2) |
| GLU121 (OE1) | 3,12 | ARG124 (NE) |
| GLU121 (OE2) | 3,55 | ARG124 (NH2) |
| GLU121 (OE2) | 3,00 | ARG124 (NE) |
| GLU123 (OE2) | 3,89 | LYS114 (NZ) |
| GLU123 (OE2) | 2,99 | LYS126 (NZ) |
| GLU172 (OE1) | 3,58 | ARG207 (NH1) |
| GLU172 (OE1) | 2,85 | ARG207 (NH2) |
| GLU177 (OE1) | 3,38 | LYS183 (NZ) |
| GLU193 (OE2) | 3,77 | LYS146 (NZ) |
| GLU202 (OE2) | 2,55 | LYS27 (NZ) |
| GLU219 (OE2) | 2,72 | LYS215 (NZ) |

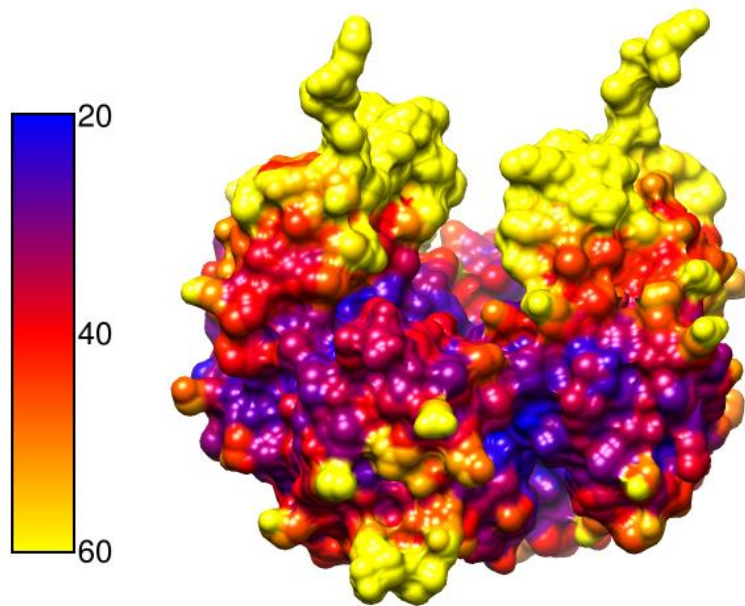


Εικόνα 4.35: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς με τη μορφή σφαιρών του ενζύμου *PnGSTU2-2.1*. Οι υπομονάδες απεικονίζονται σύμφωνα με την υδροφοβικότητα. Τα υδρόφιλα αμινοξέα παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, τα ουδέτερα με λευκό και τα υδρόφοβα με κόκκινο. Η S-νιτροβένζυλο-GSH απεικονίζεται με γαλάζιο χρώμα. Το πρόγραμμα UCSF Chimera χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της υδροφοβικότητας και την δημιουργία της εικόνας.

4.3.16.6 Δομική ευελιξία

Οι πρωτεϊνικές δομές δεν είναι στατικές, ειδικότερα οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων βρίσκονται σε συνεχή κίνηση λόγω της κινητικής ενέργειας των ατόμων. Αυτή η εσωτερική κινητικότητα και η ευελιξία των πρωτεϊνών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις βιολογικές λειτουργίες τους, όπως η κατάλυση (Daniel *et al.*, 2003), η μοριακή αναγνώριση (Boehr & Wright, 2008), η πρωτεϊνική σταθερότητα (Teilum *et al.*, 2011) και ο αλλοστερισμός (Boehr *et al.*, 2006). Ο κρυσταλλογραφικός παράγοντας B (παράμετρος ατομικής μετατόπισης) αντανακλά τη διακύμανση ενός ατόμου σχετικά με τη μέση θέση του (Yuan *et al.*, 2005). Η κατανομή των τιμών του παράγοντα B είναι μια ένδειξη της ευελιξίας της πρωτεΐνης (Kundu *et al.*, 2002). Όσο μεγαλύτερος είναι ο παράγοντας B, τόσο μεγαλύτερη είναι η κινητικότητα των ατόμων και των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων (Radivojac *et al.*, 2004). Τα αμινοξέα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες, τα ευέλικτα, τα ενδιάμεσα και τα άκαμπτα (Bornot *et al.*, 2011). Ωστόσο, ο παράγοντας B επηρεάζεται πολύ από την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, καθώς επίσης και από τα ειδικά χαρακτηριστικά της κρυσταλλοδομής (Riga *et al.*, 2017).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.36, όσον αφορά στο ένζυμο PnGSTU2-2.1 πρόκειται για ένα ένζυμο με αρκετά ευέλικτη C-τελική δομική περιοχή, καθώς επίσης και έναν ευέλικτο βρόγχο που ενώνει την N- με την C- τελική περιοχή (αμινοξέα 83-89). Τα αμινοξέα που βρίσκονται στην C-τελική περιοχή και ειδικότερα στην Η-θέση φαίνεται να έχουν υψηλές τιμές παράγοντα B. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τα αμινοξέα που βρίσκονται στον βρόγχο που ενώνει την α4 με την α5 έλικα (θέσεις 116-120), εκείνα που βρίσκονται στην α5 έλικα (θέσεις 121-126) και τέλος τα αμινοξέα της έλικας α7 (215-220). Όσον αφορά στην N-τελική ενότητα, δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα εύκαμπτη περιοχή του ενζύμου.

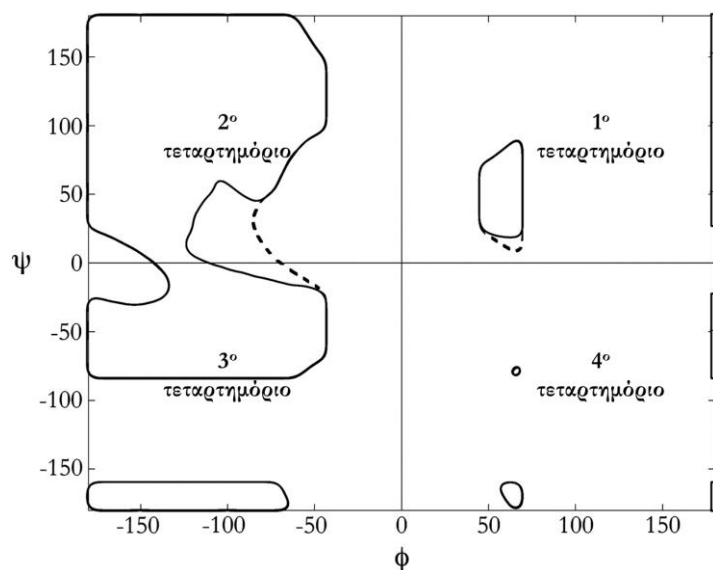


Εικόνα 4.36: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς με τη μορφή σφαιρών του ενζύμου *PnGSTU2-2.1*. Οι υπομονάδες χρωματίζονται σύμφωνα με παράγοντα B. Τα άτομα με τον μικρότερο παράγοντα B παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, ενώ με τον μεγαλύτερο παράγοντα B με κίτρινο, οι υπόλοιποι χρωματισμοί αποτελούν ενδιάμεσες τιμές του παράγοντα. Το πρόγραμμα UCSF Chimera χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών του παράγοντα B και την δημιουργία της εικόνας.

4.3.16.7 φ και ψ δίεδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού – Ramachandran Διάγραμμα

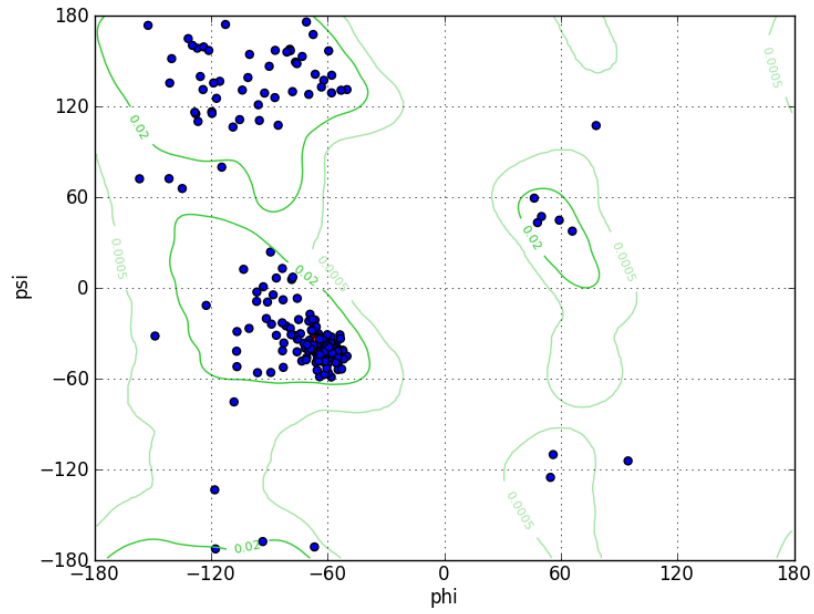
Στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, υπάρχουν δυο γωνίες στρέψης, οι οποίες περιγράφουν τις περιστροφές της κύριας αλυσίδας γύρω από τους δεσμούς του κεντρικού άνθρακα με τον άνθρακα της καρβονυλομάδας του πρώτου αμινοξέος (Ca-C) και του δεσμού της αμινομάδας με τον κεντρικό άνθρακα του επόμενου αμινοξέος (N-Ca). Η δίεδρη γωνία γύρω από τον δεσμό Ca-C ονομάζεται ψ (psi), ενώ η γωνία γύρω από τον δεσμό N-Ca ονομάζεται φ (phi) (Ramachandran *et al.*, 1963). Το Ramachandran διάγραμμα οπτικοποιεί την κατανομή των αμινοξέων στις δομές των πρωτεϊνών, βάσει των δίεδρων γωνιών φ και ψ (Hovmöller *et al.*, 2002). Στον οριζόντιο άξονα, εμφανίζονται οι τιμές φ , ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές ψ . Η αρίθμηση και των δυο αξόνων ξεκινά από το -180 και τελειώνει στο 180. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει τις επιτρεπτές ή χαμηλής ενέργειας περιοχές και τις λιγότερο επιτρεπτές περιοχές. Όσον αφορά στις λιγότερο επιτρεπτές περιοχές, είναι τιμές των δίεδρων γωνιών οι οποίες είναι απαγορευτικές, καθώς τα άτομα έρχονται πολύ κοντά με αποτέλεσμα τη σύγκρουση. Σε μια υψηλής ανάλυσης και καλής ποιότητας δομή, οι μη επιτρεπτές περιοχές πρέπει να είναι κενές ή με πολύ λίγα αμινοξέα. Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις, δηλαδή κατάλοιπα αμινοξέων με τιμές σε αυτές τις περιοχές, τα οποία συνήθως καταλήγουν σε παραμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Σε αυτές τις σπάνιες περιπτώσεις, υπάρχουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την δομή (Pal & Chakrabati, 2002). Το Ramachadran διάγραμμα μπορεί να χωριστεί σε τεταρτημόρια (Εικόνα 4.37). Στο πρώτο τεταρτημόριο βρίσκονται οι σπάνιες αριστερόστροφες α-έλικες και επιτρέπονται ορισμένες διαμορφώσεις. Στο δεύτερο τεταρτημόριο, είναι οι πιο ευνοϊκές διαμορφώσεις των ατόμων για τις β-πτυχωτές επιφάνειες (Richardson, 1981). Στο τρίτο τεταρτημόριο, βρίσκονται οι δεξιόστροφες α-έλικες και μαζί με το δεύτερο τεταρτημόριο αποτελούν τις μεγαλύτερες περιοχές. Τέλος, το τέταρτο τεταρτημόριο θεωρείται από τις λιγότερο ευνοϊκές περιοχές.



Εικόνα 4.37: Γενικό διάγραμμα Ramachadran.

Όσον αφορά στο ένζυμο *PnGSTU2-2.1*, φαίνεται ότι τα περισσότερα αμινοξέα βρίσκονται γύρω από τις στερεοδιαταξικά επιτρεπτές περιοχές (Εικόνα 4.38). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το πρόγραμμα RAMPAGE, το 95,6 % των αμινοξέων βρίσκονται στις ευνοϊκές περιοχές, το 3,4 % βρίσκονται σε επιτρεπτές περιοχές και τέλος μόνο το 1 % βρίσκεται σε μη ευνοϊκές περιοχές. Το πολύ μικρό ποσοστό των αμινοξέων στις μη επιτρεπτές περιοχές υποδεικνύει μια καλής ποιότητας και υψηλής ανάλυσης κρυσταλλική δομή.



Εικόνα 4.38: Διάγραμμα Ramachadran για το ένζυμο PnGSTU2-2.1. Τα αμινοξικά κατάλοιπα εμφανίζονται ως μπλε κουκίδες. Οι ευνοϊκές και οι επιτρεπτές περιοχές εμφανίζονται με πράσινο περίγραμμα.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι GSTs παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στους φυτικούς οργανισμούς αφού τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η ακτινοβολία, τα βαρέα μέταλλα κ.α. (LoCicero *et al.*, 2015). Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο μελετήθηκαν GSTs της *tau* τάξης από δυο φυτά που είναι πολύ σημαντικά στη γεωπονία, καθώς αποτελούν δύο από τα πιο εμπορικά όσπρια στον κόσμο, τη σόγια (*Glycine max*) και το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) (Koester *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Η *tau* τάξη των GSTs διαφέρει πολύ από τις άλλες φυτικές τάξεις, καθώς τα ένζυμα που ανήκουν σε αυτήν, εμφανίζουν ιδιαίτερες λειτουργίες (Kao *et al.*, 2016). Πράγματι, ισοένζυμα της *tau* τάξης από διαφορετικά φυτά επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης όπως χαμηλές θερμοκρασίες (Yang *et al.*, 2016), τραυματισμοί (Guan & Nothnagel, 2004), βαρέα μέταλλα (Swindell *et al.*, 2007), ζιζανιοκτόνα (Gunning *et al.*, 2014; Axarli *et al.*, 2009a).

Το ένζυμο GSTU8-8 από σόγια μελετήθηκε ως προς τα δομικά και καταλυτικά του χαρακτηριστικά. *In silico* ανάλυση, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων SoyBase, έδειξε ότι η θέση του γονιδίου *GmGSTU8-8* είναι στο χρωμόσωμα 7 και αποτελείται από δυο εξόνια, τα οποία διακόπτονται από ένα ιντρόνιο σε συντηρημένη θέση. Ο συγκεκριμένος τύπος γονιδιακής οργάνωσης είναι χαρακτηριστικό των γονιδίων της *tau* τάξης (Skopelitou *et al.*, 2016; Labrou *et al.*, 2015).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση, προκειμένου να προσδιοριστούν οι κινητικές σταθερές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια ως προς τα δυο πρότυπα υποστρώματα. Οι κινητικές σταθερές K_m για διάφορα υποστρώματα κυμαίνονται στις αναμενόμενες τιμές, συγκριτικά με άλλα ένζυμα της *tau* τάξης (Pouliou *et al.*, 2017; Labrou *et al.*, 2016; Musdal & Mannervik, 2015). Η μελέτη της θερμικής του σταθερότητας τόσο με κινητική ανάλυση όσο και με DSF έδωσε παρόμοια αποτελέσματα και ιδιαίτερα υψηλή τιμή T_m . Συγκεκριμένα, το *GmGSTU8-8* φαίνεται να είναι από τα πιο θερμοσταθερά ένζυμα της *tau* τάξης (Skopelitou *et al.*, 2016; Axarli *et al.*, 2010). Η Axarli και οι συνεργάτες της, προκειμένου να μελετήσουν την σημαντικότητα κάποιων αμινοξέων του ενζύμου *GmGSTU4-4*, πραγματοποίησαν μεταλλαξογένεση και εισήγαγαν τα επιθυμητά αμινοξέα (Ser13Ala, Asn48Ala και Pro49Ala). Η μελέτη τόσο των κινητικών παραμέτρων όσο και της θερμοσταθερότητας έδειξε ότι οι μεταλλαγμένοι κλώνοι είχαν μικρότερη συγγένεια με τα πρότυπα υποστρώματα και μικρότερη τιμή T_m σε σχέση με τον άγριο τύπο. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση τόσο της θερμοκρασίας όσο και του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η γραμμική

συσχέτιση των δεδομένων στην εξίσωση του Arrhenius και του Eyring υποδηλώνει ότι το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης (rate limiting step) παραμένει αμετάβλητο στις διαφορετικές θερμοκρασίες (Skopelitou *et al.*, 2015). Όσον αφορά στο pH, παρατηρείται ένα απότομο βέλτιστο στο 7,4. Σε άλλα ένζυμα της *tau* τάξης, το pH έχει ένα εύρος βελτίστων από 7-8 (Pouliou *et al.*, 2017; Skopelitou *et al.*, 2015). Επίσης, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα του ενζύμου με διαφορετικά υποστρώματα, τα οποία έδειξαν ότι το *GmGSTU8-8* εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης, έναντι των τοξικών υδροϋπεροξειδίων. Συγκεκριμένα, το ένζυμο χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου και το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο, γεγονός που υποδεικνύει τον λειτουργικό ρόλο του ενζύμου έναντι του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, καταλύει αντιδράσεις με ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις, οι οποίες συσσωρεύονται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, υποδηλώνοντας έτσι ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του φυτικού οργανισμού. Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι αρκετά ένζυμα της *tau* τάξης αναγνωρίζουν το fluorodiphen ως υπόστρωμα, το *GmGSTU8-8* δεν εμφανίζει τέτοια δράση (LoCicero *et al.*, 2015). Επίσης, μελετήθηκε η εκλεκτικότητά του με ανάλογα GSH, όπου φάνηκε να έχει υψηλή εξειδίκευση ως προς την GSH, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες GSTs (Adang *et al.*, 1990). Από την άλλη, το *GmGSTU8-8* είναι ικανό να δεσμεύει ποικιλία ξενοβιοτικών ενώσεων, οι οποίες δεν είναι υποστρώματα, πιθανόν έχοντας ως βασικό ρόλο την μεταφορά ή την αποθήκευσή τους. Η πρόσδεση τέτοιων ενώσεων στις GSTs οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητάς τους (Chronopoulou *et al.*, 2014). Η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου φάνηκε να αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από δυο φυσικά προϊόντα, την κερσετίνη και την κουρκουμίνη. Η κερσετίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει και άλλα ένζυμα της *tau* τάξης, όπως για παράδειγμα το *GmGSTU5-5* (Pouliou *et al.*, 2017), αλλά και GSTs της *phi* τάξης (Ahmad *et al.*, 2016).

Τέλος, μελετήθηκαν τρία ισοένζυμα από το φυτό φασόλι. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ένζυμο *PnGSTU2-2* και δυο μεταλλαγμένες μορφές, οι οποίες προέκυψαν με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης (DNA shuffling), τα *PnGSTU2-2.1* και *PnGSTU2-2.10*. Τα μεταλλαγμένα ισοένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους σε τρία αμινοξέα (Ser3Ala, Asn4Thr, Asp7Glu), ενώ με το πατρικό οι διαφορές εμφανίζονται στον Πίνακα 4.17.

Πίνακας 4.17: Οι διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία του άγριου τύπου *PnGSTU2-2* με τα μεταλλαγμένα ισοένζυμα *PnGSTU2-2.1* και *PnGSTU2-2.10*.

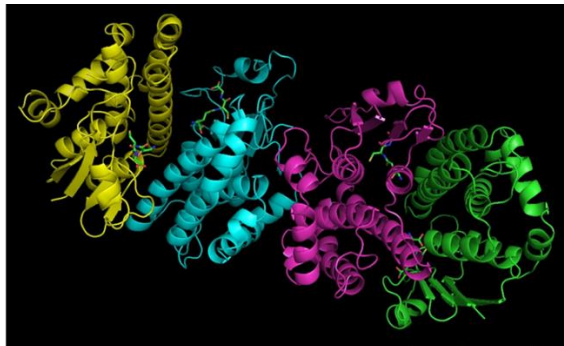
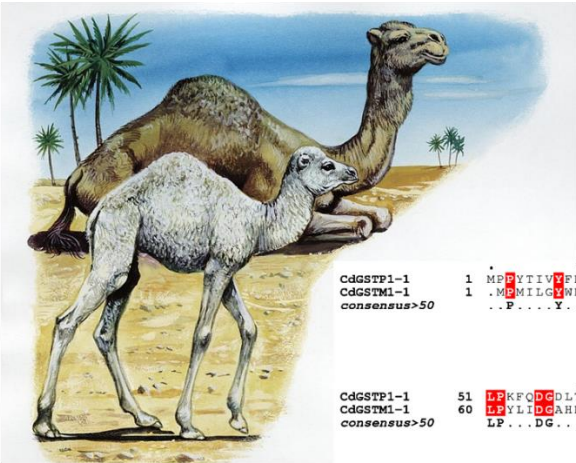
| Ένζυμο | Αμινοξικά κατάλοιπα | | | | |
|---------------------|---------------------|--------|--------|----------|----------|
| | Θέση 3 | Θέση 4 | Θέση 7 | Θέση 143 | Θέση 222 |
| <i>PnGSTU2-2</i> | Ser | Ser | Glu | Gly | Phe |
| <i>PnGSTU2-2.1</i> | Ser | Asn | Asp | Ala | Ser |
| <i>PnGSTU2-2.10</i> | Ala | Thr | Glu | Ala | Ser |

Αρχικά, μελετήθηκαν τα κινητικά τους χαρακτηριστικά και η θερμική τους σταθερότητα. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι τα δυο ισοένζυμα *PnGSTU2-2.1* και *PnGSTU2-2.10* έχουν μεγαλύτερη συγγένεια και ως προς τα δυο υποστρώματα σε σχέση με τον άγριο τύπο (*PnGSTU2-2*). Αυτό ίσως υποδηλώνει την σημαντικότητα της αλανίνης στη θέση 143, αφού βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και συγκεκριμένα στην Η-θέση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, άλλες μεταλλάξεις συγκεκριμένων αμινοξέων δεν κατάφεραν να δώσουν στα μεταλλαγμένα ένζυμα αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα ή θερμοσταθερότητα (Axarli *et al.*, 2010), κάτι που δε φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση του ενζύμου *PnGSTU2-2*. Ωστόσο, ο άγριος τύπος παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή T_m συγκριτικά με το *PnGSTU2-2.1*. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η σάρωση μιας βιβλιοθήκης φυτοπροστατευτικών ενώσεων πιθανών αναστολέων των ενζύμων *PnGSTU2-2.1* και *PnGSTU2-2.10*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα εντομοκτόνο, το Teflubenzuron, αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό το *PnGSTU2-2.1* και έτσι μελετήθηκε περαιτέρω ο τύπος αναστολής που επιφέρει. Η μελέτη έδειξε ότι το συγκεκριμένο εντομοκτόνο προκαλεί μερικώς μικτή αναστολή, δηλαδή προσδέεται σε διαφορετική θέση από αυτήν του υποστρώματος, σχηματίζοντας ένα αδρανές σύμπλοκο χωρίς όμως παράλληλα να απαγορεύει την δέσμευση του υποστρώματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της μεταλλαγμένης μορφής *PnGSTU2-2.1*, η οποία συνέβαλε στην κατανόηση των δομικών και καταλυτικών λειτουργιών του ενζύμου. Συγκεκριμένα, το υπό μελέτη ένζυμο παρουσιάζει την κλασσική GST αναδίπλωση, αποτελείται από δυο δομικές περιοχές την N- και C-τελική περιοχή, στις οποίες βρίσκονται οι θέσεις πρόσδεσης της GSH (G- θέση) και των ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Η- θέση) και κρυσταλλώνεται ως οκταμερές. Η $\alpha 2$ -έλικα ενώνεται με την $\beta 3$ -πτυχωτή επιφάνεια με έναν βρόγχο που περιέχει προλίνη σε cis διαμόρφωση (Han *et al.*, 2013). Στο *PnGSTU2-2.1*, πρόκειται για την προλίνη (Pro58), που δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην κατάλυση, ωστόσο είναι πολύ σημαντικό κατάλοιπο για την διατήρηση της πρωτεΐνης σε καταλυτικά ικανή διαμόρφωση (Skopelitou *et al.*, 2015). Το καταλυτικό αμινοξύ είναι η σερίνη (Ser16) και, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.31, παίζει

καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση της S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Σύμφωνα με τον παράγοντα B, η C- τελική περιοχή φαίνεται να είναι πιο εύκαμπτη σε σχέση με την υπόλοιπη πρωτεΐνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSTs) ΑΠΟ *Camelus dromedarius*



CdGSTP1-1
CdGSTM1-1
consensus>50

```
1 M P P Y I V Y F P V R G R C E A M R M L A D Q D Q S W K E V V T M E T W F A L K P S . . . . . C L Y G Q  
1 . M G M I L C H W D I R C L A H A H L D E Y T G S D Y E K I Y S M G D A D D Y D R S Q W L S E K F K L G L D F P N  
.. P . . . . Y . I R G . . A . R $ L L . . . . . E . I . . M . . P . . S . . . . . % . #
```

CdGSTP1-1
CdGSTM1-1
consensus>50

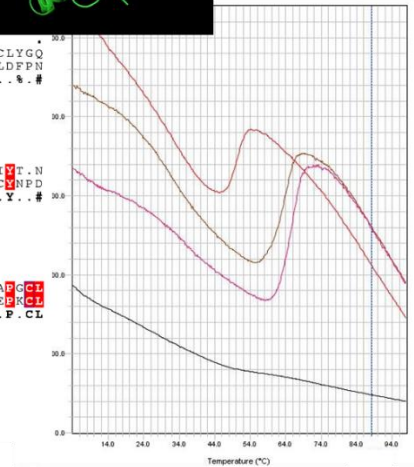
```
51 L P K F Q D C D L I L Y Q S N A I L R H L G R S L G L V C K D Q Q C A A L L D V V N D G V E D L R C K Y V I L I Y T . N  
60 L P Y L I D C A H R L T Q S N A I L R Y I A R K H N D C C E T E E K I R V D L E N Q A M D T R L D F A R V C Y N P D  
L P . . . D G . . . L . Q S N A I L R . . . R . . . L . G . # # E . . . . D V . # # . . . D . R . % . . . Y . #
```

CdGSTP1-1
CdGSTM1-1
consensus>50

```
110 Y E A G E E Y V A I P E H L K P E T L I S Q N Q G G A F I V E N Q I S F A D Y N L L D L I L N H Q V L A P G C I  
120 F E K L M P F L K E I P E K M S L S E P L G . . . K R T W F A C D K L N Y V D F L A Y D V L D V Y R I F P P K C L  
% E . . K . G % . K . . P E . $ K . F . . L . . . . . G # . . . . % . D % . . . D . L . . . ! . . P . C L
```

CdGSTP1-1
CdGSTM1-1
consensus>50

```
170 D E F P L L S A Y V A R L S A R P K L R A F L A S P E H V K R P I N G N G K Q . . . .  
176 D E F P N L K D F M S R F E G L R K I S A Y M K S R F L R S D L F L K M A M W G N K  
D . F P . L . . . . R . . . . K . . A % $ . S . . . . . P . . . . .
```



5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

5.1.1 Ζωϊκές GSTs

Τα θηλαστικά είναι εκτεθειμένα σε πολλούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες ή ακόμα και να τα οδηγήσουν σε θάνατο. Τέτοιοι παράγοντες συχνά είναι ξενοβιοτικές τοξικές ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την λειτουργία των οργανισμών. Αυτές οι ενώσεις ενεργοποιούν έναν μηχανισμό αποτοξίνωσης, που αποτελείται από δυο φάσεις: (α) την ενεργοποίηση- Φάση I και (β) την αποτοξίνωση- Φάση II. Οι GSTs εμπλέκονται στην Φάση II αυτού του μηχανισμού και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) τις κυτταροπλασματικές (cGSTs), (β) τις μιτοχονδριακές (mGSTs) και (γ) τις μεμβρανικές μικροσωμικές (MGSTs) (Labrou *et al.*, 2015; Hayes *et al.*, 2005). Στα θηλαστικά, έχουν βρεθεί επτά τάξεις, η ταξινόμηση των οποίων βασίζεται στο ποσοστό ομοιότητας της πρωτεϊνικής τους αλληλουχίας αλλά και στο ποσοστό ομοιότητας συγκεκριμένων συντηρημένων αμινοξέων (Arbildi *et al.*, 2017). Συγκεκριμένα, χωρίζονται στις εξής τάξεις: *alpha* (A), *zeta* (Z), *theta* (T), *mu* (M), *pi* (P), *sigma* (S) και *omega* (O) (Mannervik, 2012). Πρόκειται για ομοδιμερή ένζυμα, κάθε υπομονάδα των οποίων αποτελείται από ένα ενεργό κέντρο. Σε κάθε υπομονάδα υπάρχουν δυο διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης, μια στο N-τελικό άκρο όπου βρίσκεται η G- θέση, θέση πρόσδεσης της GSH και μια στο C-τελικό άκρο, η H- θέση, όπου προσδένονται τα υδρόφοβα υποστρώματα.

Στο παρόν κεφάλαιο, μελετήθηκαν ένζυμα δυο διαφορετικών τάξεων GSTs από καμήλα, το CdGSTP1-1 και το CdGSTM1-1. Οι καμήλες της Σαουδικής Αραβίας αντιπροσωπεύουν το 16 % της συνολικής ζωϊκής βιομάζας και έχουν υψηλή οικονομική αξία, δεδομένου ότι αποτελούν την κύρια πηγή κρέατος (Al-Swailem *et al.*, 2010). Επομένως, οι λειτουργίες των γονιδίων της καμήλας, οι οποίες εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης και προσαρμογής είναι ένας πολύ σημαντικός τομέας έρευνας (Perperopoulou *et al.*, 2016). Η επιλογή των συγκεκριμένων ισοενζύμων έγινε λόγω της σημαντικότητάς τους όχι μόνο στον μηχανισμό αποτοξίνωσης του οργανισμού αλλά και σε άλλες λειτουργίες που βοηθούν στην προσαρμογή του οργανισμού σε συνθήκες αντίξοες όπως αυτές που επικρατούν στην έρημο.

5.1.2 GSTP1-1

Το ένζυμο GSTP1-1 στα θηλαστικά παίζει πολύ σημαντικό ρόλο αφού έχει πολλές διαφορετικές λειτουργίες. Κατ' αρχάς, είναι υπεύθυνο για την προστασία των οργανισμών από την τοξικότητα διάφορων ξενοβιοτικών ενώσεων αλλά και των μεταβολιτών τους (Sun *et al.*, 2010). Ωστόσο, αυτή η λειτουργία δεν ωφελεί πάντα τον οργανισμό, αφού αυτό το ένζυμο αναγνωρίζει τα φάρμακα ως ξενοβιοτικά και τα αποβάλλει, άρα εμποδίζει την θεραπεία σε διάφορες περιπτώσεις ασθενειών. Το GSTP1-1 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε όγκους και έχει μελετηθεί εκτενώς για την σχέση που έχει με την αντοχή στα φάρμακα (Townsend & Tew, 2003). Άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η απουσία συγκεκριμένων GSTs από τον οργανισμό είναι δείκτης ευαισθησίας σε συγκεκριμένους καρκίνους ή ακόμα η απουσία έκφρασης του GSTP1 σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη οφείλεται σε μετατροπές του ενζύμου (Meiers *et al.*, 2007). Η εμφάνιση του συγκεκριμένου ενζύμου σε περιπτώσεις καρκίνου το καθιστούν μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων που ενεργοποιούνται στις θέσεις που υπερεκφράζεται. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, αλλά και στη μεταγωγή σήματος μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών σε συνθήκες καταπόνησης (Wu *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα, η GSTP1-1 αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο της κινάσης (Jun), τροποποιώντας έτσι το αποπτωτικό αποτέλεσμα (Federici *et al.*, 2009). Μια άλλη λειτουργία της GSTP1 είναι η προσθήκη GSH στις πρωτεΐνες, που ονομάζεται γλουταθειονυλίωση, με αποτέλεσμα να ρυθμίζει την καταλυτική δραστηριότητα και την βιολογική λειτουργία τους. Τέλος, η GSTP1-1 είναι ένζυμο ικανό να σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση (Manevich *et al.*, 2004).

5.1.3 GSTM1-1

Το ένζυμο GSTM1 είναι μελετημένο κυρίως στον άνθρωπο αφού σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου. Έρευνες έχουν δείξει ότι άτομα με έλλειψη του συγκεκριμένου ενζύμου είναι ευπαθή να εμφανίσουν καρκίνο, εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας να αποτοξινώνονται από καρκινογόνους εξωγενείς παράγοντες (McIlwain *et al.*, 2006). Επίσης, το ένζυμο GSTM1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες άλλα συμμετέχει και στο μηχανισμό αποτοξίνωσης των οργανισμών (Moyer *et al.*, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι το ένζυμο αυτό σχετίζεται με την ασθένεια του Πάρκινσον, αλλά και με διάφορες άλλες ασθένειες, οι οποίες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Gui *et al.*, 2016). Η μελέτη του συγκεκριμένου ενζύμου από καμήλα πραγματοποιήθηκε προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα η προσαρμογή και επιβίωση της καμήλας στην έρημο.

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Βιολογικά υλικά

Τα πλασμίδια (pET-28a(+)) και pET-3a) με κλωνοποιημένα τα γονίδια των ενζύμων τρανσφεράσης της γλουταθειόνης P1-1 και M1-1 από καμήλα (*Camelus dromedarius*) ήταν προσφορά του καθηγητή Farid S. Ataya (Πανεπιστήμιο King Saud).

5.2.2 Ένζυμα και προτεΐνες

Χρησιμοποιήθηκε θρομβίνη της εταιρείας Sigma-Aldrich, προκειμένου να απομακρυνθούν οι 6 ιστιδίνες από το αμινοτελικό άκρο (6-His tag).

Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

5.2.3 Μετασχηματισμός εκφραστικών κυττάρων και ετερόλογος έκφραση των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1

Κατόπιν μετασχηματισμού εκφραστικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με ανασυνδυασμένο DNA των πλασμιδίων pET-28a(+)*CdGSTP1-1* και pET-3a*CdGSTM1-1*, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιείχε καναμυκίνη (50 μg/mL) και αμπικιλίνη (100 μg/mL), αντίστοιχα. Ο μετασχηματισμός και η έκφραση πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφοι 2.14 και 2.15, αντίστοιχα.

5.2.4 Καθαρισμός των ενζύμων CdGSTP1-1 και CdGSTM1-1

Ο καθαρισμός του ενζύμου *CdGSTP1-1* πραγματοποιήθηκε μέσω μεταλλοχημικής χρωματογραφίας συγγένειας έχοντας ως προσροφητή Ni-NDA (1 mL). Το ένζυμο έφερε στο αμινοτελικό του άκρο επίτοπο 6-His, ώστε να πραγματοποιηθεί καθαρισμός μέσω μεταλλοχημικής χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-NDA. Η μεταλλοχημική χρωματογραφία εκμεταλλεύεται την ικανότητα των αμινοξικών καταλοίπων His, να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων προς μεταλλοκατιόντα-δέκτες ηλεκτρονίων, συγκεκριμένα το Ni²⁺. Το μεταλλοκατιόν (Ni²⁺) σχηματίζει χηλικό σύμπλοκο με το ιμινοδιοξικό οξύ, το οποίο συγκρατεί ισχυρά το μεταλλοκατιόν μέσω δεσμών συναρμογής που μετέχουν τα καρβοξυλικά οξυγόνα και το άζωτο, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος καταλαμβάνονται προσωρινά από μόρια νερού. Τα αμινοξέα με χαρακτήρα δότη ηλεκτρονίων(π.χ. His) αλληλεπιδρούν με τις θέσεις του μεταλλοκατιόντος που καταλαμβάνονται από μόρια νερού και έτσι το ένζυμο δεσμεύεται στον προσροφητή.

Τέλος, η έκλυση του ενζύμου επιτυγχάνεται με την προσθήκη ιμιδαζολίου, το οποίο λειτουργεί συναγωνιστικά έναντι των ιστιδινών. Στην Εικόνα 3.2, Κεφάλαιο 3, Παράγραφος 3.2.7.1, φαίνονται τα στάδια και η διαδικασία που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-NDA (1 mL).

Μετά τον καθαρισμό, το καθαρό ένζυμο υποβλήθηκε σε διαπίδυση με διάλυμα PBS:

- 140 mM NaCl,
- 2,7 mM KCl,
- 10 mM Na₂HPO₄,
- 1,8 mM KH₂PO₄

προκειμένου να γίνει αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος. Πραγματοποιήθηκε πέψη με θρομβίνη (5 U/mg πρωτεΐνης) και επώαση για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την απομάκρυνση των έξι ιστιδινών. Μετά το πέρας των 4 h, το ένζυμο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.19. Με αυτόν τον τρόπο, διαχωρίστηκε το ένζυμο χωρίς τις έξι ιστιδίνες, αφού προσροφήθηκε στον προσροφητή συγγένειας.

Ο καθαρισμός του ενζύμου *CdGSTM1-1* πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη 1,4-βουτανεδιολο-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH) (1 mL), όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.19.

Η δραστηριότητα του ενζύμου των εκλούσεων καθώς και η συνολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκαν φωτομετρικά, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφοι 2.20 και 2.22, αντίστοιχα. Η καθαρότητα του ενζύμου των εκλούσεων αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (§2.24).

5.2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1* ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Προκειμένου να μελετηθεί η εκλεκτικότητα των δυο ενζύμων, πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικοί προσδιορισμοί χρησιμοποιώντας διάφορες ενώσεις που δυνητικά λειτουργούν ως υποστρώματα των GSTs. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.25.

5.2.6 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση),
- **CDNB:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - CdGSTP1-1: 0,35 – 6 mM
 - CdGSTM1-1: 0,0375 – 2,1 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης
 - CdGSTP1-1: 0,05 – 4,5 mM
 - CdGSTM1-1: 0,01 – 3,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH).

5.2.7 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων

Για τα πειράματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι του υποστρώματος CDNB σε θερμοκρασιακό εύρος:

- 4 - 40°C για το CdGSTP1-1
- 4 - 53,5°C για το CdGSTM1-1

σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η υπολειπόμενη δραστηριότητα (%) ύστερα από επώαση 5 min σε κάθε θερμοκρασία και υπολογίστηκε η θερμοκρασία τήξεως των ενζύμων (T_m). Η θερμοκρασία T_m είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το ένζυμο χάνει το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας.

5.2.8 Θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου CdGSTP1-1 σε διάφορες θερμοκρασίες

Προκειμένου να μελετηθεί η θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε κινητική θερμικής αδρανοποίησης στους 25, 37 και 45°C. Συγκεκριμένα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου, το οποίο βρισκόταν στην αντίστοιχη θερμοκρασία. Ο ρυθμός αδρανοποίησης για κάθε θερμοκρασία υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Παραμένουσα Δραστηριότητα} = (1 - F)e^{-k_{\text{fast}}t} + Fe^{-k_{\text{slow}}t}$$

όπου F είναι το κλάσμα του ενζύμου που δεν έχει αδρανοποιηθεί και k_{fast} και k_{slow} οι σταθερές ρυθμού της γρήγορης και της αργής φάσης αντίστοιχα.

5.2.9 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων με DSF

Για τον χαρακτηρισμό της σταθερότητας των ενζύμων πραγματοποιήθηκε DSF. Η παρακολούθηση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών από 25 - 65°C για το CdGSTP1-1 και από 4 - 99°C για το ένζυμο CdGSTM1-1 με ρυθμό αύξησης 1°C/min. Σε τελικό όγκο 20 μL , χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα | 5 μL |
| Χρωστική (8X) | 2,5 μL |
| Ένζυμο | CdGSTP1-1: 0,71 μg |
| | CdGSTM1-1: 2,52 μg |
| Δις απιονισμένο νερό | Μέχρι τα 20 μL |

Όσον αφορά στο *CdGSTM1-1*, μελετήθηκε η επίδραση του φυτοφαρμάκου Zoxium zoxamide, το οποίο φάνηκε να είναι ισχυρός αναστολέας του ενζύμου, καθώς επίσης η επίδραση της GSH και της S-εξυλ-GSH σε σύμπλοκο με το ένζυμο. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε, αφού έχει φανεί ότι η πρόσδεση άλλων μορίων στην πρωτεΐνη, τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με αυτήν, αυξάνει τη σταθερότητα της και άρα την τιμή T_m (Niesen *et al.*, 2007). Η διαδικασία και οι ποσότητες για αυτά τα πειράματα ήταν ίδιες με αυτά των πειραμάτων για τον προσδιορισμό της τιμής T_m . Ο αναστολέας μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20 και 50 μM . Η GSH και η S-εξυλ-GSH μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,5 mM.

5.2.10 Μελέτη της εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου *CdGSTP1-1* από το ιζώδες και το pH

Η επίδραση του ιζώδους μελετήθηκε στους 37°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5, το οποίο περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %).

Όσον αφορά στην εξάρτηση από το pH, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε pH από 4,7 έως 8,6. Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κιτρικών/φωσφορικών ρυθμισμένα με τα επιθυμητά pH.

5.2.11 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1*

Για τον προσδιορισμό της αναστολής των GSTs από διάφορες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δραστηρότητας τους στους 37°C πριν και μετά την έκθεση τους σε αυτές. Όλες οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις διαλύθηκαν σε ακετόνη. Σε τελικό όγκο 1 mL, περιέχονταν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM
- **GSH:** 2,5 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Πιθανός αναστολέας:** 100 μM

Πιο αναλυτικά, η σάρωση περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.28.

5.2.12 Υπολογισμός της τιμής IC₅₀

Για τον υπολογισμό του IC₅₀ πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου αναστολέα. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η δραστικότητα του ενζύμου CdGSTM1-1 υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοπροστατευτικού Zoxium zoxamide με ένα εύρος τιμών από 0,01-10 μM.

5.2.13 Κινητική μελέτη αναστολής του ενζύμου CdGSTM1-1 ως προς το zoxium zoxamide

Δεδομένου ότι η αντίδραση που καταλύεται από την GST απαιτεί την παρουσία δύο υποστρωμάτων, η κινητική μελέτη αναστολής για την επιλεγμένη ένωση απαιτεί επιμέρους κινητικές μελέτες για κάθε ένα από τα δυο υποστρώματα χωριστά.

5.2.13.1 Κινητική μελέτη αναστολής του CdGSTM1-1 έχοντας το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η CdGSTM1-1 με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **CDNB:** 0,15 – 1,75 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Αναστολέας:** οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη Παράγραφο 5.3.10

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστικότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB).

5.2.13.2 Κινητική μελέτη αναστολής του *CdGSTM1-1* έχοντας την *GSH* ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η *CdGSTM1-1* με την *GSH* ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 1 mL που περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** 0,12 – 3,6 mM
- **Ένζυμο:** ανάλογα με τις μονάδες του ενζυμικού παρασκευάσματος
- **Αναστολέας:** οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται αναλυτικά στη Παράγραφο 5.3.11

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.20 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (*GSH*).

5.2.14 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i

Ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.2.17.

5.2.15 Μοριακή μοντελοποίηση και βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου *CdGSTP1-1*

Πραγματοποιήθηκε μοριακή μοντελοποίηση και βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου *CdGSTP1-1*, έχοντας ως πρότυπο τη δομή με κωδικό 2oac (*Mus musculus*). Το ποσοστό ομολογίας ήταν 87,92 % και έτσι δημιουργήθηκε ένα αρκετά αξιόπιστο μοντέλο για την ανάλυση της δομής του υπό μελέτη ενζύμου. Η ομόλογη δομή βρέθηκε μέσω του προγράμματος SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006), ενώ οι εικόνες δημιουργήθηκαν μέσω του προγράμματος UCSF Chimera. Το πρόγραμμα CastP χρησιμοποιήθηκε για να βρεθούν οι κοιλότητες του ενζύμου (Dundas *et al.*, 2006). Τέλος, η πολλαπλή αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ESPript 3.0.

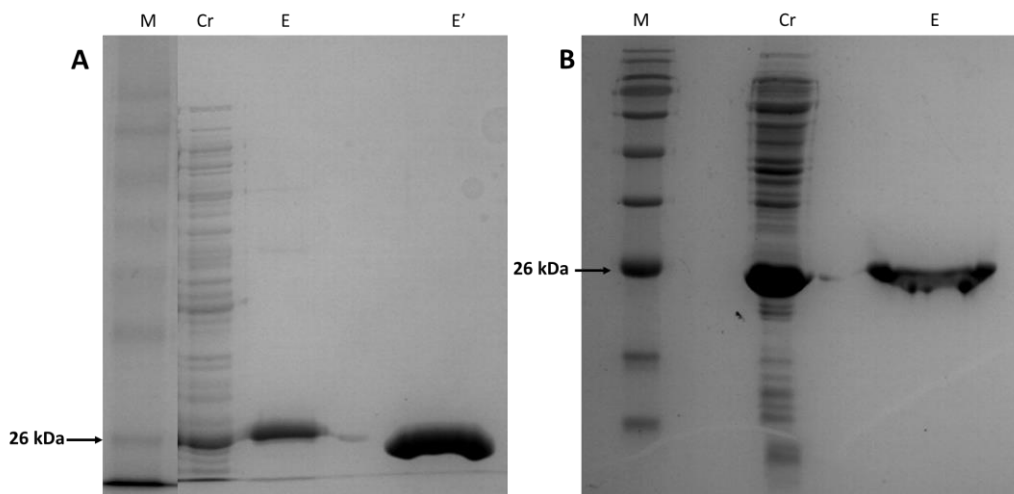
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1 Καθαρισμός των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1*

Αφού μετασηματίστηκαν εκφραστικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) με ανασυνδυασμένο DNA των πλασμιδίων pET-28a(+)*CdGSTP1-1* και pET-3a*CdGSTM1-1* και εκφράστηκαν όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 5.2.3, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός των ενζύμων. Το ένζυμο *CdGSTP1-1* έφερε στο αμινοτελικό του άκρο έξι ιστιδίνες για πιο εύκολο καθαρισμό μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας (§5.2.4). Ο καθαρισμός μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας είχε απόδοση 12,5 % και το ένζυμο καθαρίστηκε 3 φορές. Ύστερα από την πέψη με θρομβίνη, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας ώστε να διαχωριστεί το ένζυμο το οποίο δεν έφερε πλέον τις έξι ιστιδίνες από εκείνο που δεν είχε υποστεί πέψη. Η απόδοση με την χρωματογραφία συγγένειας ήταν 57 %.

Όσον αφορά στο *CdGSTM1-1*, ο καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας συγγένειας είχε απόδοση 39,2 %.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 5.1).



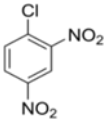
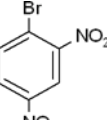
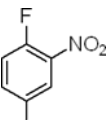
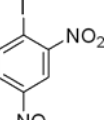
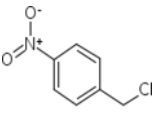
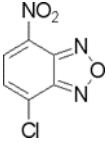
Εικόνα 5.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. (A) M: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, Cr: Ενζυμικό παρασκεύασμα πριν τον καθαρισμό (crude) του ενζύμου *CdGSTP1-1*, E: Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλυσης καθαρής πρωτεΐνης του ενζύμου *CdGSTP1-1*, το οποίο φέρει στο αμινοτελικό του άκρο τις έξι ιστιδίνες, E': Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλυσης καθαρής πρωτεΐνης του ενζύμου *CdGSTP1-1*, το οποίο έχει υποστεί πέψη με θρομβίνη και έχουν απομακρυνθεί οι έξι ιστιδίνες. (B) M: Πρωτεϊνικός μάρτυρας, Cr: Ενζυμικό παρασκεύασμα πριν τον καθαρισμό (crude) του ενζύμου *CdGSTM1-1*, E: Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της έκλυσης καθαρής πρωτεΐνης του ενζύμου *CdGSTM1-1*.

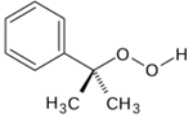
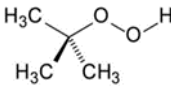
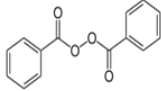
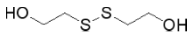
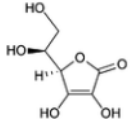
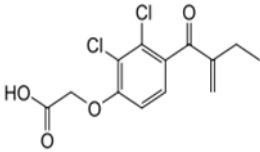
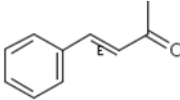
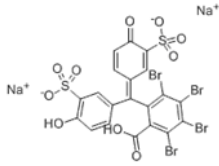

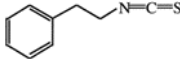
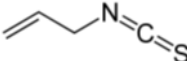
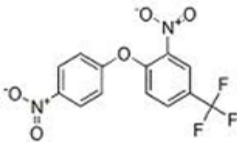
Τα αποτελέσματα της Εικόνας 5.1 επιβεβαιώνουν την επιτυχία του καθαρισμού, αφού παρατηρούμε την καθαρότητα του ενζύμου πριν και μετά την διαδικασία του καθαρισμού.

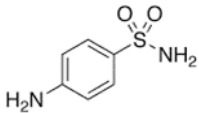
5.3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ενζύμων ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Η εκλεκτικότητα των δυο ενζύμων μελετήθηκε ως προς μια βιβλιοθήκη διαφορετικών υποστρωμάτων (§2.25). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

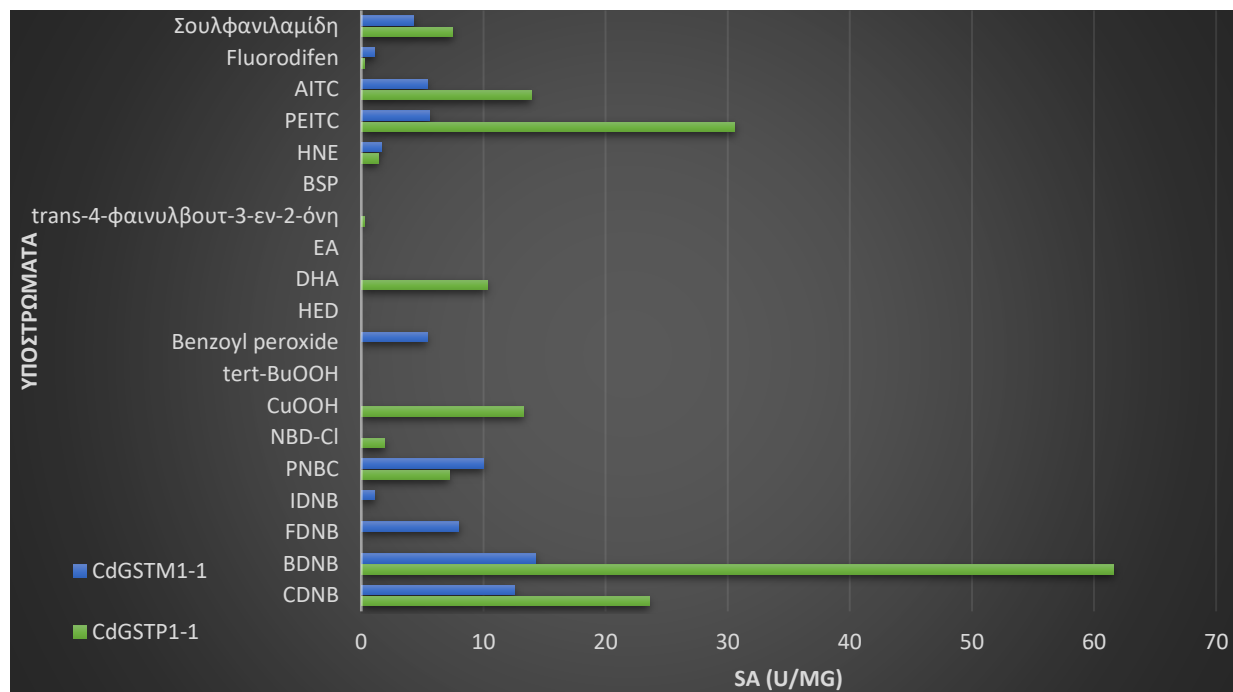
Πίνακας 5.1: Ειδική δραστικότητα των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1* ως προς διαφορετικά υποστρώματα.

| Υπόστρωμα | Δομή | Ειδική Δραστικότητα <i>CdGSTP1-1</i> (SA) (U/mg) | Ειδική Δραστικότητα <i>CdGSTM1-1</i> (SA) (U/mg) |
|--|---|--|--|
| 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) |  | 23,6 | 12,57 |
| 1-βρώμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB) |  | 61,6 | 14,28 |
| 1-φθόρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB) |  | M.A. | 8 |
| 1-ιώδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) |  | M.A. | 1,1 |
| π-νιτροβένζυλ-χλωρίδιο (PNBC) |  | 7,2 | 10 |
| 4-χλωρο-7-νιτροβενζο-2-οξο-1,3-διαζόλιο (NBD-Cl) |  | 1,94 | M.A. |

| | | | |
|--|---|------|------|
| Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου (CuOOH) |  | 13,3 | M.A. |
| t-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tert- BuOOH) |  | M.A. | M.A. |
| Βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο (benzoyl peroxide) |  | M.A. | 5,4 |
| 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) |  | M.A. | M.A. |
| Διυδροασκορβικό οξύ (DHA) |  | 10,3 | M.A. |
| Εθακρινικό οξύ (EA) |  | M.A. | M.A. |
| trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη |  | 0,28 | M.A. |
| Βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) |  | M.A. | M.A. |
| Trans-2-ενενάλη (HNE) |  | 1,4 | 1,66 |
| Ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας (PEITC) |  | 30,6 | 5,6 |
| Ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας (AITC) |  | 13,9 | 5,4 |
| Fluorodifen |  | 0,28 | 1,1 |

| | | | |
|-----------------------|---|-----|-----|
| Σουλφανιλαμίδη |  | 7,5 | 4,3 |
|-----------------------|---|-----|-----|

Μ.Α.: Μη Ανιχνεύσιμο



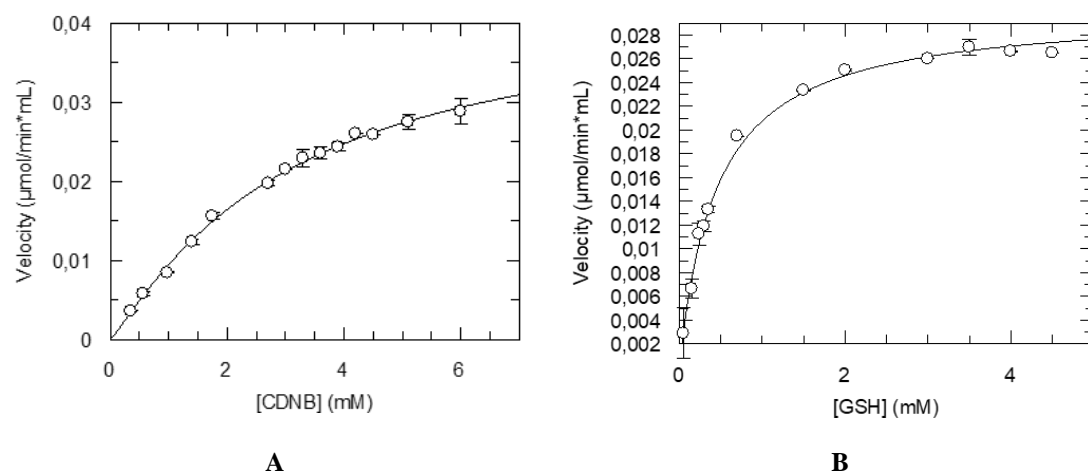
Εικόνα 5.2: Συγκριτικό διάγραμμα της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1* έναντι των πιθανών υποστρωμάτων. Οι τιμές του ενζύμου *CdGSTP1-1* αναπαρίστανται με πράσινες ράβδους, ενώ του ενζύμου *CdGSTM1-1* με μπλε.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.1 και της Εικόνας 5.2, το ένζυμο *CdGSTP1-1* εμφανίζει δραστηριότητα με δώδεκα από τα δεκαεννιά υποστρώματα που μελετήθηκαν, ενώ το *CdGSTM1-1* είναι δραστικό με έντεκα από τα υπό μελέτη υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, και τα δυο ένζυμα αναγνωρίζουν τις αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις ως υποστρώματα με τη διαφορά ότι το *CdGSTP1-1* δεν εμφανίζει καθόλου δραστηριότητα με το FDNB και το IDNB, ενώ το *CdGSTM1-1* δεν αναγνωρίζει ως υπόστρωμα μόνο το NBD-Cl από αυτήν την ομάδα υποστρωμάτων. Επιπλέον, μετρήθηκε η δράση υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από την GSH (GPOX) των ενζύμων. Το *CdGSTP1-1* αποδέχεται το CuOOH ως υπόστρωμα, ενώ το *CdGSTM1-1* εμφάνισε δραστηριότητα με το βενζοϊκό υδροϋπεροξειδίο. Κανένα από τα δυο ένζυμα δεν αποδέχεται την HED, το EA, ούτε την BSP ως υποστρώματα. Μόνο το *CdGSTP1-1* φαίνεται να έχει δράση διϋδροασκορβικής ρεδοκτάσης, καταλύοντας την αναγωγή του DHA σε ασκορβικό οξύ με αναγωγικό μέσο την GSH. Επίσης, το ίδιο φαίνεται να έχει μέτρια δραστηριότητα με την

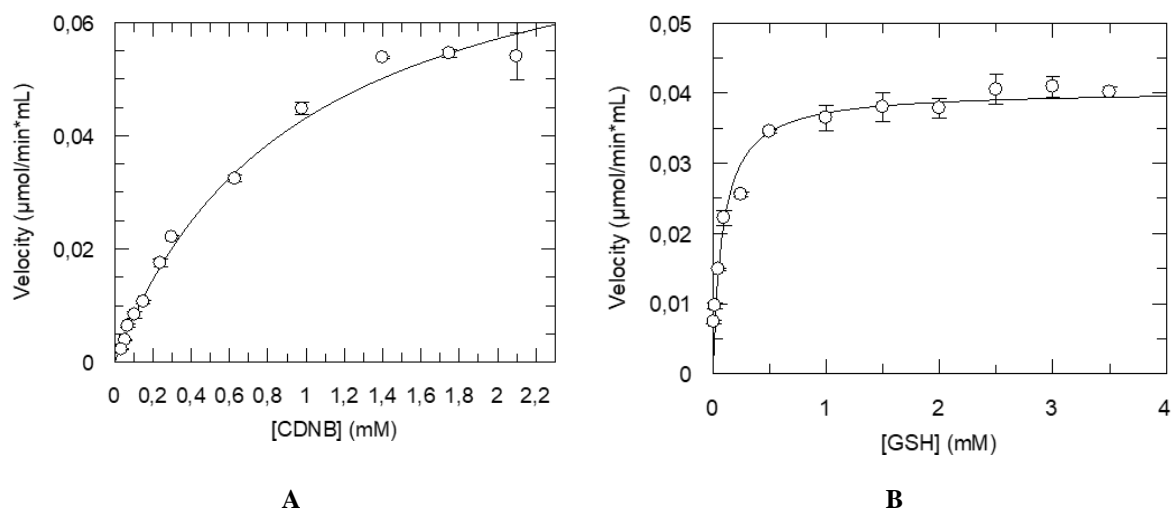
trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη. Και τα δυο ένζυμα φαίνεται να καταλύουν την αντίδραση GSH με τη HNE, καθώς επίσης και την αντίδραση προσθήκης τηςθειόλης της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άνθρακα της ισοθειοκυανικής ομάδας με υποστρώματα τον AITC και τον PEITC. Τέλος, και τα δυο ένζυμα εμφάνισαν μέτρια δραστικότητα ως προς την σουλφανιλαμίδα και τον διφαινυλικό αιθέρα fluorodifen.

5.3.3 Κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς το CDNB και την GSH

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των δυο ενζύμων ως προς τα δυο υποστρώματα, προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράμετροι K_m και k_{cat} (Πίνακας 5.2). Η κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 5.2.6. Στις Εικόνες 5.3 και 5.4, παρουσιάζονται τα γραφήματα της κινητικής ανάλυσης των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1*, αντίστοιχα.



Εικόνα 5.3: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CdGSTP1-1* (A) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1mM.



Εικόνα 5.4: Κινητική ανάλυση του ενζύμου *CdGSTM1-1* (A) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (B) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

Πίνακας 5.2: Κινητική ανάλυση των *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1* για το σύστημα CDNB/GSH.

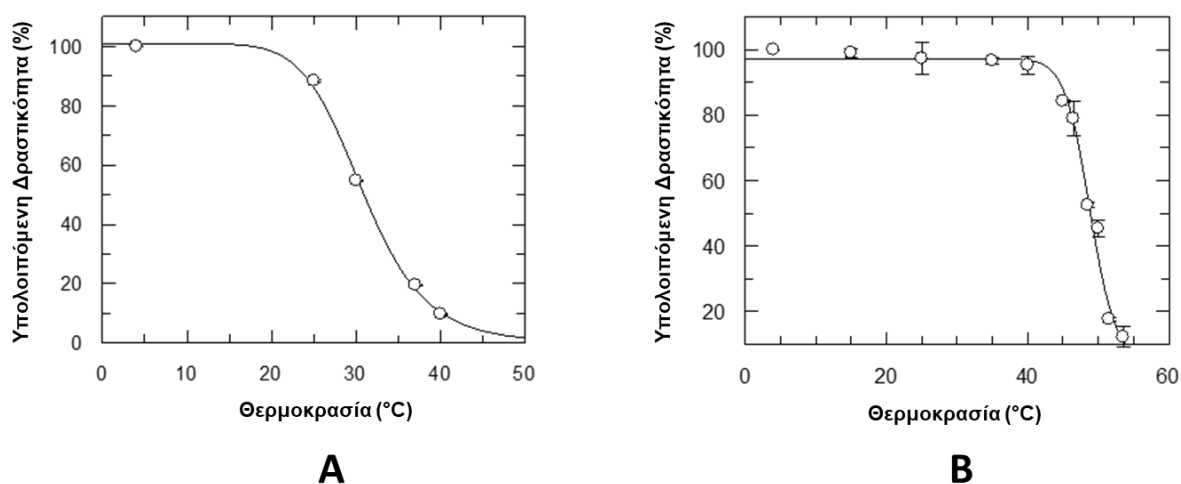
| ENZYMΟ | ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ | CDNB | GSH |
|------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| <i>CdGSTP1-1</i> | K_m (mM) | $4,5 \pm 0,35$ | $0,45 \pm 0,024$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | $320 \pm 5,8$ | |
| <i>CdGSTM1-1</i> | K_m (mM) | $0,84 \pm 0,0994$ | $0,0867 \pm 0,0117$ |
| | k_{cat} (min^{-1}) | 1608 ± 82 | |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.2, τα δυο ένζυμα από καμήλα υπακούουν στην εξίσωση κινητικής των Michaelis-Menten. Το *CdGSTM1-1* έχει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τα δυο υποστρώματα, συγκριτικά με το *CdGSTP1-1*. Η παράμετρος K_m για την GSH του *CdGSTP1-1* είναι σχετικά πολύ κοντά με την τιμή που έχει βρεθεί στο αντίστοιχο ισοένζυμο από άνθρωπο (Georgakis *et al.*, 2017), ωστόσο η ίδια παράμετρος ως προς το CDNB είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν του ανθρώπινου ισοενζύμου (Pouliou *et al.*, 2015). Όσον αφορά στο *CdGSTM1-1* σε σύγκριση με το ανθρώπινο ισοένζυμο, η παράμετρος K_m για το CDNB του *CdGSTM1-1* υπολογίστηκε περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από του ανθρώπου (Georgakis *et al.*, 2017).

5.3.4 Μελέτη της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων

Προκειμένου να μελετηθεί η θερμική σταθερότητα των δυο ενζύμων, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί του κάθε ενζύμου αφού είχε επωαστεί για πέντε min σε ένα εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη

Παράγραφο 5.2.7. Στην Εικόνα 5.5, παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής αδρανοποίησης του κάθε ενζύμου.

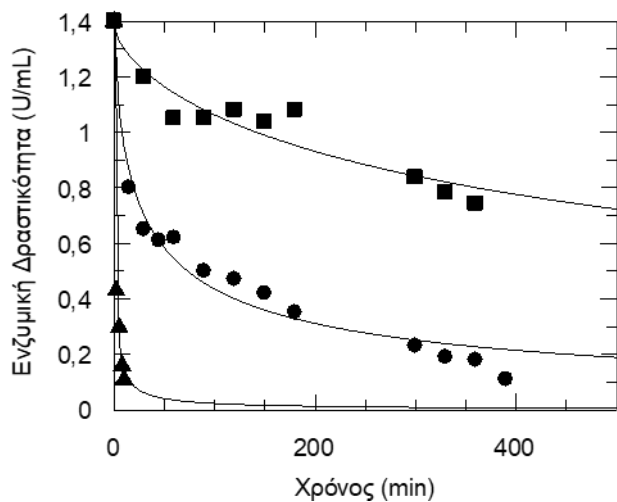


Εικόνα 5.5: Καμπύλες θερμικής αδρανοποίησης για το ένζυμο *CdGSTP1-1* (A) και για το ένζυμο *CdGSTM1-1* (B).

Στην συνέχεια, υπολογίστηκαν οι τιμές T_m και για τα δυο ένζυμα. Για το ένζυμο *CdGSTP1-1*, η τιμή αυτή είναι πολύ χαμηλή, $30,8^{\circ}\text{C} \pm 0,38$, ενώ το *CdGSTM1-1* εμφανίζει αρκετά μεγαλύτερη τιμή T_m , $49,09^{\circ}\text{C} \pm 0,2$.

5.3.5 Θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου *CdGSTP1-1* σε διάφορες θερμοκρασίες

Κινητική ανάλυση της διαδικασίας θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου εμφάνισε διφασική κινητική με άμεση απενεργοποίηση που εμφανίστηκε αμέσως και αργή απενεργοποίηση που συνεχίζεται περισσότερο (Εικόνα 5.6). Κατά το αρχικό στάδιο, μια ποσότητα του ενζύμου απενεργοποιείται ταχέως (γρήγορο βήμα), ενώ το υπόλοιπο μετατρέπεται σε μια άλλη τροποποιημένη δραστική ακόμα μορφή με αργότερο ρυθμό (αργό βήμα). Στον Πίνακα 5.3, παρουσιάζονται οι σταθερές ρυθμού γρήγορης και αργής φάσης για τις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν.



Εικόνα 5.6: Κινητική θερμικής αδρανοποίησης. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε σε διαφορετικούς χρόνους ύστερα από επώαση του ενζύμου στους 25°C (■), στους 37°C (●) και στους 45°C (▲).

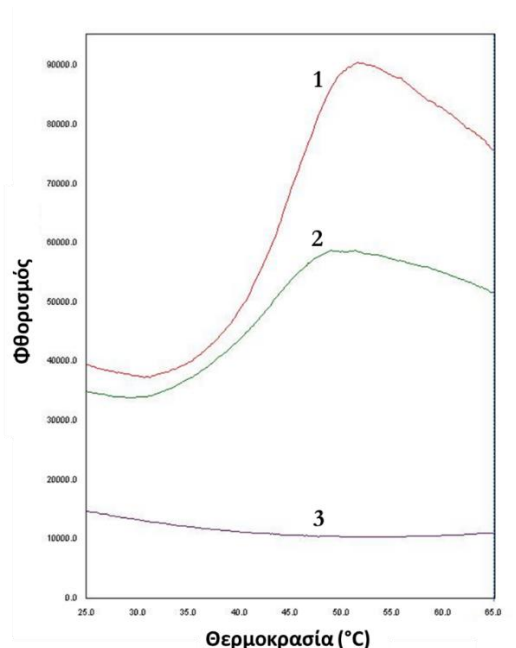
Πίνακας 5.3: Ρυθμός αδρανοποίησης για την γρήγορη και αργή φάση.

| Θερμοκρασία (°C) | $k_{fast} (min^{-1})(10^{-4})$ | $k_{slow} (min^{-1})(10^{-4})$ |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 25 | 111,6 | 12,2 |
| 37 | 133,3 | 41,3 |
| 45 | 735,4 | 96,7 |

Το ποσοστό της αδρανοποίησης κατά την γρήγορη φάση φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία, αφού ο ρυθμός αδρανοποίησης της γρήγορης φάσης επηρεάζεται περισσότερο σε σύγκριση με τον ρυθμό της αργής φάσης.

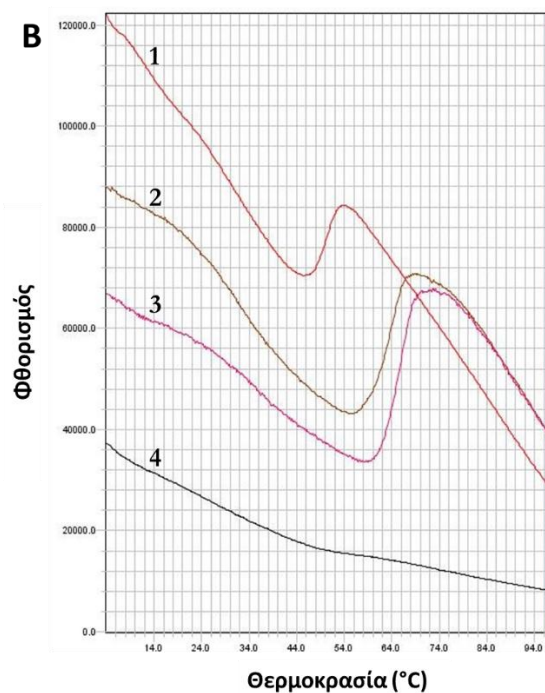
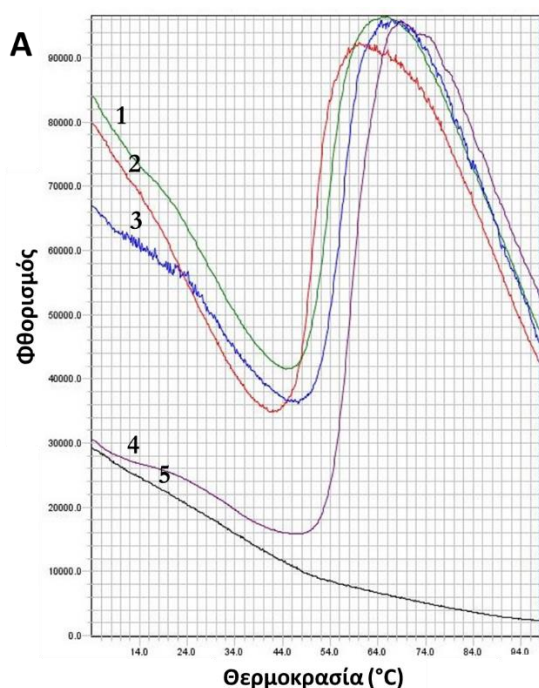
5.3.6 Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων με DSF

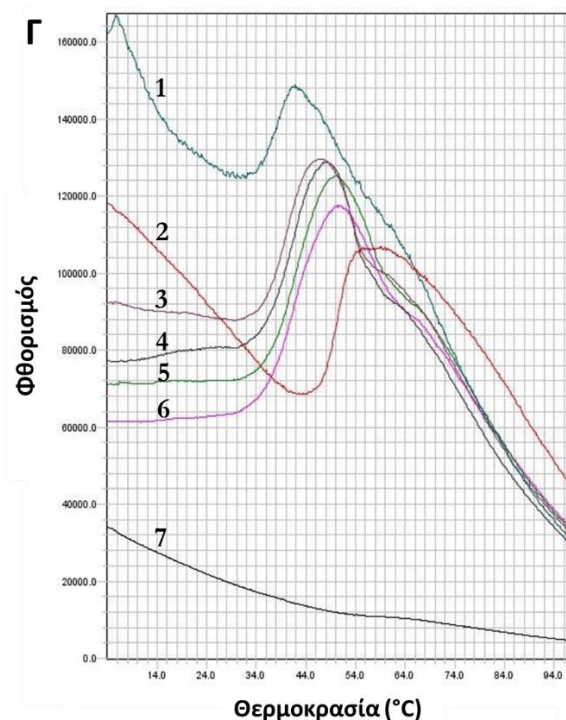
Η θερμική σταθερότητα των ενζύμων μελετήθηκε επίσης με DSF. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη Παράγραφο 5.2.9. Σχετικά με το ένζυμο CdGSTP1-1, δε μελετήθηκε μόνο η θερμική σταθερότητα με την συγκεκριμένη μέθοδο αλλά και η θερμική σταθερότητα σε σχέση με την συγκέντρωση πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (0,51 μg και 0,71 μg) (Εικόνα 5.7). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται να επηρεάζεται η σταθερότητα του ενζύμου από την ποσότητα πρωτεΐνης, αφού η κορυφή της καμπύλης, η οποία αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης, είναι μετατοπισμένη προς τα δεξιά και άρα η T_m είναι μεγαλύτερη.



Εικόνα 5.7: Καμπύλη θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου *CdGSTP1-1* για δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις με τη μέθοδο διαφορικής σάρωσης φθορισμού (DSF). (1) [*CdGSTP1-1*]: 0,71 μg , (2) [*CdGSTP1-1*]: 0,51 μg , (3) μάρτυρας (απουσία ενζύμου).

Το ένζυμο *CdGSTM1-1* μελετήθηκε με DSF, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσον ενώσεις που δεσμεύονται σε αυτό το καθιστούν πιο θερμοσταθερό. Για τον λόγο αυτόν, μελετήθηκε η επίδραση 0,1, 0,5 και 1 mM GSH και 0,1 και 0,5 mM S-εξυλ-GSH στην θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρόσδεση των δυο αυτών ενώσεων φαίνεται να σταθεροποιεί το ένζυμο (Εικόνα 5.8Α και Β). Αντίθετα, η πρόσδεση του αναστολέα του ενζύμου Zoxium zoxamide φαίνεται να μειώνει την T_m του ενζύμου ακόμα και σε πολύ μικρή συγκέντρωση της ένωσης (Εικόνα 5.8Γ).



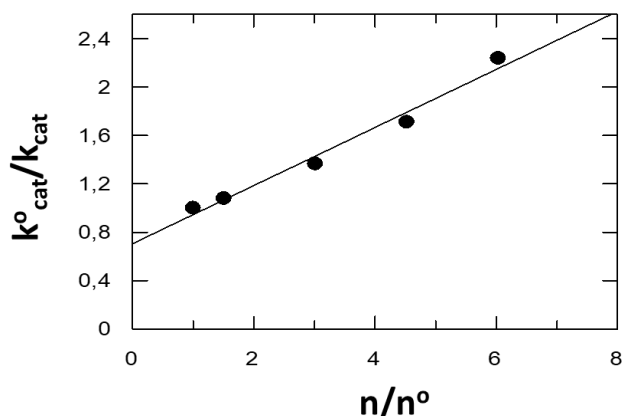


Εικόνα 5.8: Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης του ενζύμου *CdGSTM1-1* με τη μέθοδο της διαφορικής σάρωσης φθορισμού (DSF) (Α) παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης GSH με 2,25 μg πρωτεΐνης: (1) [GSH]: 0,1 mM, (2) [GSH]: 0 mM, (3) [GSH]: 0,5 mM, (4) [GSH]: 1 mM, (5) μάρτυρας (απουσία ενζύμου). (Β) παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης S-εξυλ-GSH με 2,5 μg πρωτεΐνης: (1) [S-εξυλ-GSH]: 0 mM, (2) [S-εξυλ-GSH]: 0,1 mM, (3) [S-εξυλ-GSH]: 0,5 mM, (4) μάρτυρας (απουσία ενζύμου). (Γ) παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης zoxium zoxamide με 2,13 μg πρωτεΐνης: (1) [Zoxium zoxamide]: 50 μM , (2) [Zoxium zoxamide]: 0 μM , (3) [Zoxium zoxamide]: 20 μM , (4) [Zoxium zoxamide]: 10 μM , (5) [Zoxium zoxamide]: 5 μM , (6) [Zoxium zoxamide]: 1 μM , (7) μάρτυρας (απουσία ενζύμου).

5.3.7 Μελέτη της εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου *CdGSTP1-1* από το ιζώδες και το pH

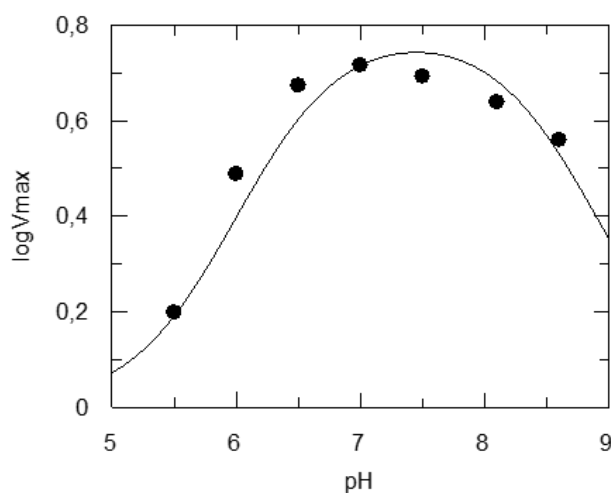
Η επίδραση του ιζώδους μελετήθηκε προκειμένου να βρεθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης (rate limiting step). Η τιμή k_{cat} μειώνεται καθώς αυξάνεται το ιζώδες (n), όταν η καθυστέρηση της αντίδρασης οφείλεται είτε στην απελευθέρωση του προϊόντος είτε στην δομική αναδιάταξη της πρωτεΐνης, η οποία ελέγχεται από τη διάχυση. Όταν η γραφική παράσταση $k^{\circ}_{\text{cat}}/k_{\text{cat}}$ (όπου k°_{cat} είναι η τιμή για n° , δηλαδή χωρίς γλυκερόλη) έναντι του n/n° είναι γραμμική και η κλίση ίση με τη μονάδα, τότε η απελευθέρωση του προϊόντος αποτελεί καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης, ενώ όταν η κλίση είναι σχεδόν ίση με το μηδέν, τότε η δομική αναδιάταξη της πρωτεΐνης αποτελεί καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης (Labrou *et al.*, 2016; Kolawole, 2016; Labrou *et al.*, 2001). Η γραφική παράσταση $k^{\circ}_{\text{cat}}/k_{\text{cat}}$ έναντι του n/n°

έδωσε γραμμική εξάρτηση του ιξώδους με κλίση $0,24 \pm 0,02$, άρα το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με τις δομικές ανακατατάξεις της πρωτεΐνης (Εικόνα 5.9).



Εικόνα 5.9: Γραφική παράσταση της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική παράμετρο k_{cat} του ενζύμου CdGSTP1-1. Εξάρτηση του k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του n/n^0 . Η ευθεία υπολογίστηκε με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων.

Η εξάρτηση της V_{max} από το pH μελετήθηκε με σκοπό να βρεθούν τα ιονισμένα αμινοξέα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση της αντίδρασης και στην πρόσδεση του υποστρώματος. Έτσι, υπολογίστηκαν οι τιμές pK_a , οι οποίες παρέχουν βασικές γνώσεις για τις πιθανές καταλυτικές λειτουργίες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου, συνεπώς και του μηχανισμού ενζυμικής δράσης (Krajewska,2016).



Εικόνα 5.10: Εξάρτηση της κινητικής παραμέτρου V_{max} του ενζύμου CdGSTP1-1 από το pH. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M με διαφορετικά pH.

Σύμφωνα με την Εικόνα 5.10, η εξάρτηση της παραμέτρου V_{max} από το pH εμφανίζει μια κωδωνοειδή καμπύλη, με δυο σημεία καμπής που αντιστοιχούν σε $pK_{a1} = 6 \pm 0,2$ και $pK_{a2} = 8,4 \pm 0,2$. Είναι ευρέως γνωστό ότι η καταλυτική δράση των GSTs επιτυγχάνεται μειώνοντας το pK_a της σουλφυδρυλομάδας της δεσμευμένης GSH, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η νουκλεοφιλικότητα (Deponete, 2013). Στην GSTP1, αυτό επιτυγχάνεται με το αμινοξύ τυροσίνη (Tyr8), του οποίου η υδροξυλική ομάδα δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την σουλφυδρυλομάδα της δεσμευμένης GSH (Perperopoulou *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 1992). Έχει αποδειχθεί ότι το pK_a της σουλφυδρυλομάδας της δεσμευμένης GSH

κυμαίνεται στο 6-6,5, όπως συμβαίνει και στο ισοένζυμο GSTP1-1 από άνθρωπο, άρα το pK_{a1} που βρέθηκε από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να υποδεικνύει τον ιονισμό της σουλφυδυλομάδας της GSH. Όσον αφορά στο pK_{a2} , η τιμή που υπολογίστηκε βάσει των αποτελεσμάτων είναι πολύ κοντά στις τιμές που έχουν παρατηρηθεί για τα αμινοξέα λυσίνη (Lys) ή κυστεΐνη (Cys), που πιθανόν να εμπλέκονται στην δέσμευση του υποστρώματος ή/και στην κατάλυση (Skopelitou *et al.*, 2015).

5.3.8 Σάρωση φυτοπροστατευτικών ενώσεων ως πιθανών αναστολέων των ενζύμων

Προκειμένου να χαρακτηριστεί η ικανότητα των δυο ενζύμων να δεσμεύουν ενώσεις, οι οποίες δεν λειτουργούν ως υποστρώματα, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση τους με διάφορες ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα. Στον Πίνακα 5.4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σάρωσης αυτών των ενώσεων συγκριτικά και για τα δυο ένζυμα.

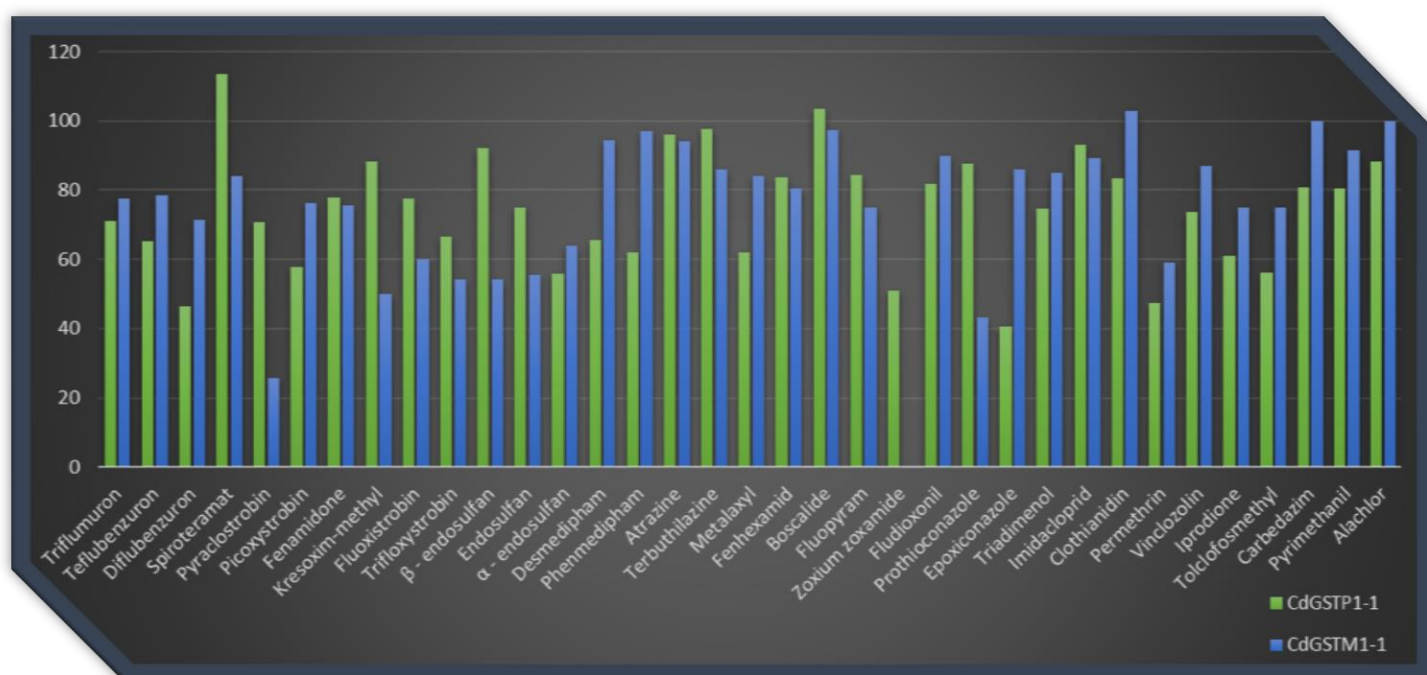
Πίνακας 5.4: Η παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα κάθε ενζύμου έναντι των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

| Κατηγορία Ένωσης | Φυτοπροστατευτική Ένωση | Παραμένουσα Δραστηριότητα (%) | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | | <i>Cd</i> GSTP1-1 | <i>Cd</i> GSTM1-1 |
| Φαινυλακυλουρίες | Triflumuron | 71,2 | 77,7 |
| | Teflubenzuron | 65,4 | 78,6 |
| | Diflubenzuron | 46,5 | 71,4 |
| Εστέρας τετρονικού οξέος | Spiroteramat | 113,6 | 84,2 |
| Στρομπιλουρίνες | Pyraclostrobin | 70,8 | 25,7 |
| | Picoxystrobin | 57,8 | 76,4 |
| | Fenamidone | 77,8 | 75,7 |
| | Kresoxim-methyl | 88,1 | 50 |
| | Fluoxistrobin | 77,7 | 60 |
| | Trifloxystrobin | 66,6 | 54,3 |
| | β - endosulfan | 92,2 | 54,3 |

| | | | |
|---------------------------------|-----------------|-------|------|
| Οργανοχλωριωμένα | Endosulfan | 75 | 55,5 |
| | α - endosulfan | 55,8 | 63,8 |
| Διφαινυλικοί αιθέρες | Desmedipham | 65,6 | 94,4 |
| | Phenmedipham | 62,1 | 97,1 |
| Τριαζίνες | Atrazine | 96,1 | 94,2 |
| | Terbuthilazine | 97,6 | 86 |
| Ανιλίδια | Metalaxyl | 61,9 | 84,2 |
| | Fenhexamid | 83,7 | 80,5 |
| | Boscalide | 103,4 | 97,2 |
| Βενζαμίδια | Fluopyram | 84,4 | 75 |
| | Zoxium zoxamide | 51 | 0 |
| Φαινυλοπυρρολικό | Fludioxonil | 81,8 | 90 |
| Τριαζόλια | Prothioconazole | 87,5 | 43,1 |
| | Epoconazole | 40,5 | 86,1 |
| | Triadimenol | 74,6 | 85 |
| Νεοκοτινοειδή | Imidacloprid | 93,2 | 89,3 |
| | Clothianidin | 83,3 | 103 |
| Πυρεθροειδές | Permethrin | 47,5 | 59 |
| Δικαρβοξιμίδια | Vinclozolin | 73,8 | 87,1 |
| | Iprodione | 60,9 | 75 |
| Οργανοφωσφορικός εστέρας | Tolclofosmethyl | 56,2 | 75 |
| Βενζιμιδαζόλιο | Carbedazim | 80,7 | 100 |
| Ανιλικό-πυριμιδίνη | Pyrimethanil | 80,5 | 91,4 |
| Χλωροακεταμίδια | Alachlor | 88,3 | 100 |

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, κανένα από τα δυο ένζυμα δεν εμφανίζει μεγάλη ικανότητα να δεσμεύει τις ξενοβιοτικές ενώσεις, οι οποίες δεν είναι υποστρώματα. Ωστόσο, το *CdGSTM1-1* φαίνεται να αναστέλλεται πλήρως από το μυκητοκτόνο βενζαμίδιο zoxium zoxamide, ενώ η ίδια ένωση επιφέρει αναστολή 50 % στο ισοένζυμο *CdGSTP1-1*. Σε γενικές γραμμές, δε φαίνεται τα δυο ένζυμα να δεσμεύουν τις ίδιες ομάδες φυτοπροστατευτικών ενώσεων, ωστόσο, οι ενώσεις με έναν αρωματικό δακτύλιο (πχ.

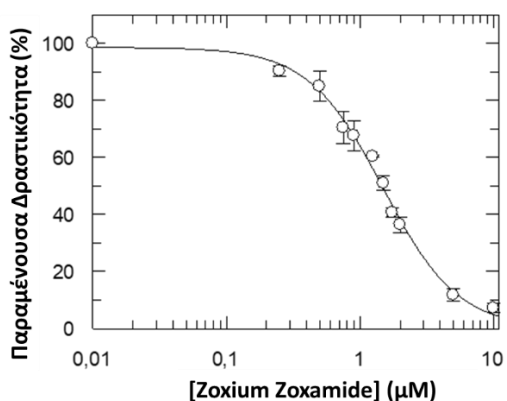
atrazine,alachlor κ.λπ) φαίνεται να επιφέρουν χαμηλή έως μηδενική αναστολή και στα δυο ένζυμα. Επιπλέον, η ένωση permethrin φαίνεται ικανή να αναστέλλει σε μέτριο βαθμό και τα δυο ένζυμα. Όσον αφορά στο *CdGSTP1-1*, μεγαλύτερες ενώσεις με δυο αρωματικούς δακτυλίους (π.χ epoxiconazole, diflubenzuron) προκαλούν υψηλότερη αναστολή σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν.



Εικόνα 5.11: Συγκριτικό διάγραμμα της παραμένουσας δραστηκότητας των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1* έναντι των φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Οι τιμές του ενζύμου *CdGSTP1-1* αναπαρίστανται με πράσινες ράβδους, ενώ του ενζύμου *CdGSTM1-1* με μπλε.

5.3.9 Υπολογισμός της τιμής IC_{50} για το ένζυμο *CdGSTM1-1* έναντι του μυκητοκτόνου *zoxium zoxamide*

Κατόπιν της σάρωσης της βιβλιοθήκης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, μελετήθηκε περαιτέρω το μυκητοκτόνο *zoxium zoxamide*, το οποίο φάνηκε να αναστέλλει πλήρως την δράση του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Αρχικά, βρέθηκε η τιμή IC_{50} , δηλαδή η τιμή του μυκητοκτόνου που επιφέρει 50 % μείωση της αρχικής δράσης του ενζύμου. Στην Εικόνα 5.12, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της παραμένουσας δραστηκότητας του ενζύμου έναντι της συγκέντρωσης του αναστολέα.

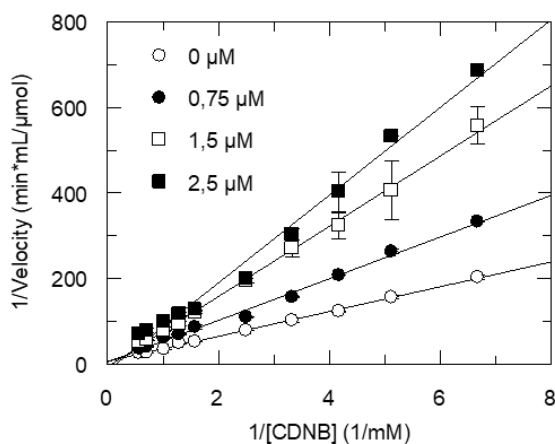


Εικόνα 5.12: Καμπύλη συγκέντρωσης-παραμένουσας δραστηκότητας για το εντομοκτόνο zoxium zoxamide. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH και είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων. Η τιμή IC_{50} είναι $1,49 \pm 0,068 \mu M$.

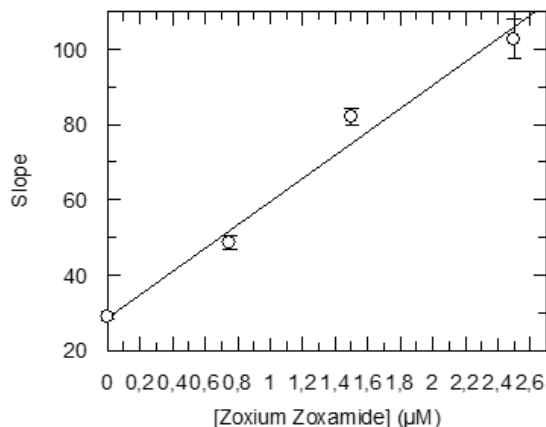
5.3.10 Κινητική μελέτη αναστολής του zoxium zoxamide με το ένζυμο CdGSTM1-1

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη κινητική μελέτη με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης για την ένωση που επιλέχθηκε, ακολουθώντας τις συνθήκες που περιγράφονται στη Παράγραφο 5.2.13.1.

Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα (0,75 μM , 1,5 μM και 2,5 μM), καθώς επίσης και απουσία αναστολέα (Εικόνα 5.13 και 5.14).

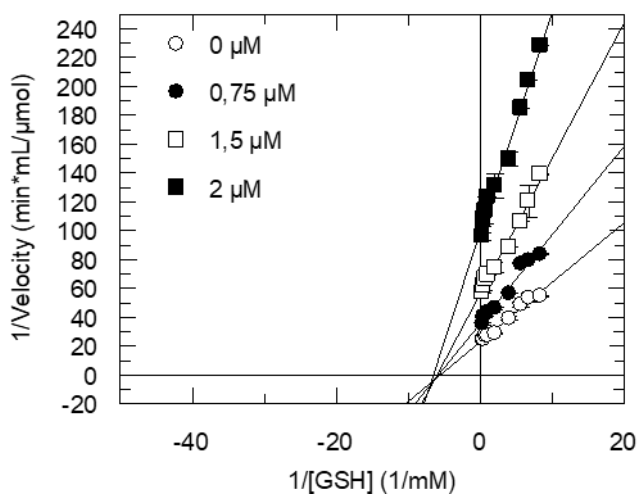


Εικόνα 5.13: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος CDNB για τρεις συγκεντρώσεις του αναστολέα.

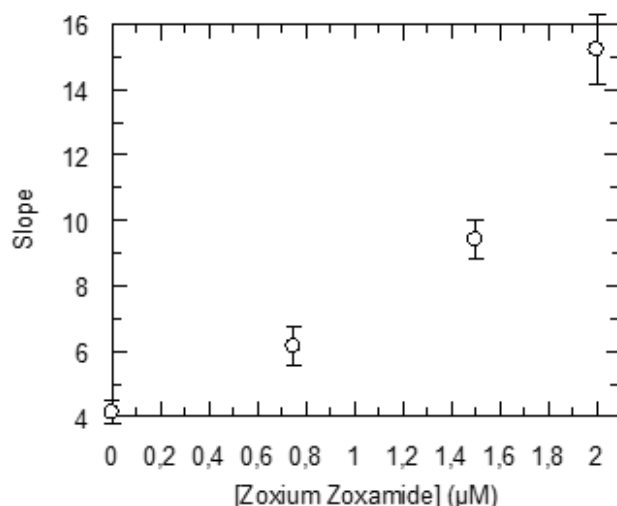


Εικόνα 5.14: Δευτερογενής γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 5.13. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της αναστολής έχοντας την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 5.2.13.2. Η συγκεκριμένη ένωση μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,75 μM, 1,5 μM και 2 μM). Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα διπλά αντίστροφα (Εικόνα 5.15) καθώς επίσης και η δευτερογενής παράσταση (Εικόνα 5.16).



Εικόνα 5.15: Γραφική απεικόνιση Lineweaver-Burk (διπλά αντίστροφα) της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος GSH για τρεις συγκεντρώσεις του αναστολέα.

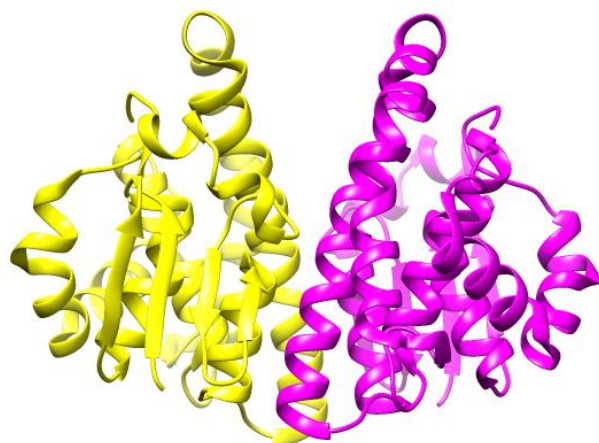


Εικόνα 5.16: Δευτερογενής γραφική απεικόνιση που προκύπτει από δεδομένα της Εικόνας 5.15. Απεικονίζει την κλίση των ευθειών (slopes) συναρτήσεων της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Ύστερα από τις κινητικές αναστολής ως προς τα δυο υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη Παράγραφο 5.3.10, παρατηρείται καθαρά συναγωνιστική αναστολή ως προς το CDNB. Η σταθερά αναστολής K_i υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 5.2.14. Η σταθερά K_i είναι $0,96 \pm 0,29 \mu\text{M}$. Όσον αφορά στον τύπο αναστολής ως προς την GSH (§5.3.11), παρατηρήθηκε μερικώς μικτή αναστολή με $K_i = 0,074 \pm 0,012 \mu\text{M}$ και $K_i' = 0,018 \pm 0,0026 \mu\text{M}$.

5.3.14 Μοριακή μοντελοποίηση και βιοϋπολογιστική ανάλυση του ενζύμου *CdGSTP1-1*

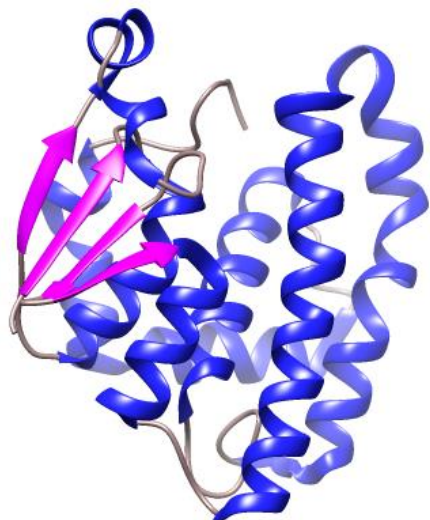
Αφού βρέθηκε αξιόπιστο πρότυπο για τον σχεδιασμό της δομής του ενζύμου, έγινε αναπαράσταση της δομής με το πρόγραμμα UCSF-Chimera (Εικόνα 5.17).



Εικόνα 5.17: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς του ενζύμου *CdGSTP1-1*. Η μια υπομονάδα απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα, ενώ η άλλη με μωβ. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

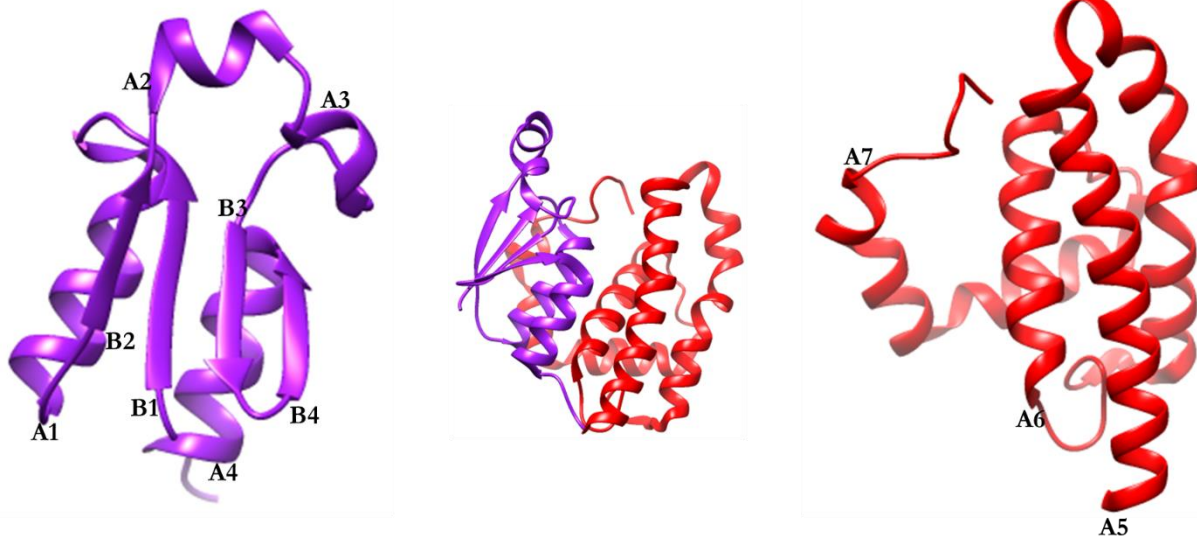
Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, φαίνεται ότι το υπό μελέτη ένζυμο εμφανίζει την χαρακτηριστική GST αναδίπλωση. Πρόκειται για ένα ομοδιμέρες, κάθε υπομονάδα του οποίου αποτελείται από μια συντηρημένη N-περιοχή, η οποία είναι η θέση δέσμευσης της

GSH και από μια C-περιοχή, η οποία αποτελεί θέση δέσμευσης των ξενοβιοτικών ενώσεων (Εικόνα 5.18).



Εικόνα 5.18: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *CdGSTP1-1*. Οι α -έλικες απεικονίζονται με μπλε και οι β -πτυχωτές επιφάνειες με μωβ. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Η N-τελική δομική ενότητα αποτελείται από α -έλικες (α_1 , α_2 , α_3 και α_4) και β -πτυχωτές επιφάνειες (β_1 , β_2 , β_3 και β_4), ενώ η C-τελική δομική ενότητα αποτελείται μόνο από α -έλικες (α_5 , α_6 και α_7) (Εικόνα 5.19).



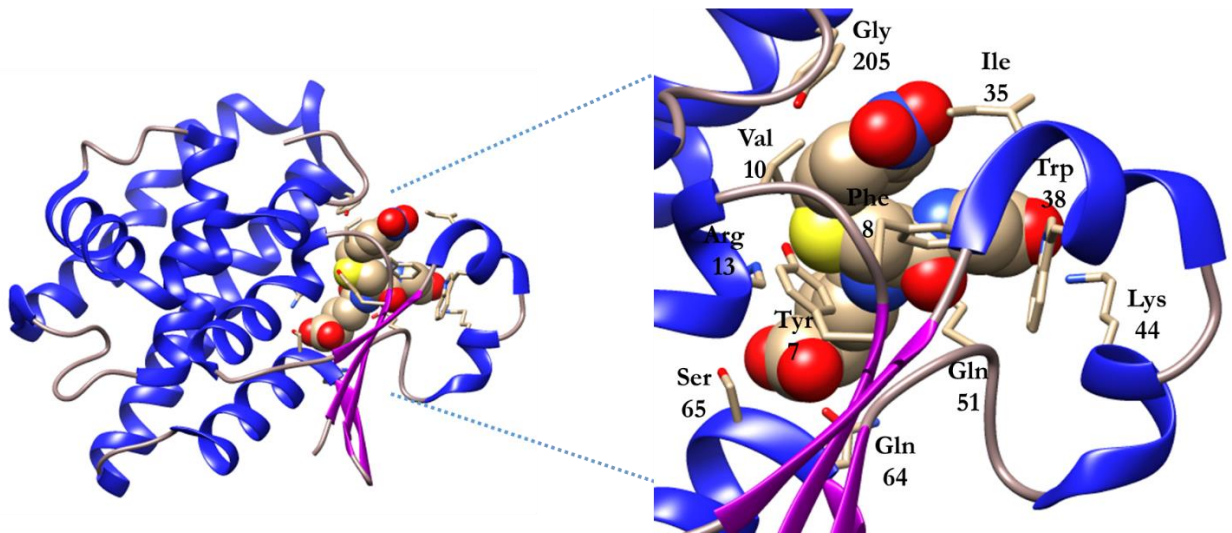
Εικόνα 5.19: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *CdGSTP1-1*. Η N-τελική περιοχή απεικονίζεται με μωβ χρώμα και η C-τελική περιοχή με κόκκινο. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Στην Εικόνα 5.20, παρουσιάζονται οι α -έλικες και οι β -πτυχωτές επιφάνειες, καθώς επίσης και η ανάλυση της δευτερογενούς δομής του ενζύμου σε σχέση με άλλες ομόλογες GSTs που ανήκουν στην *pi* τάξη.



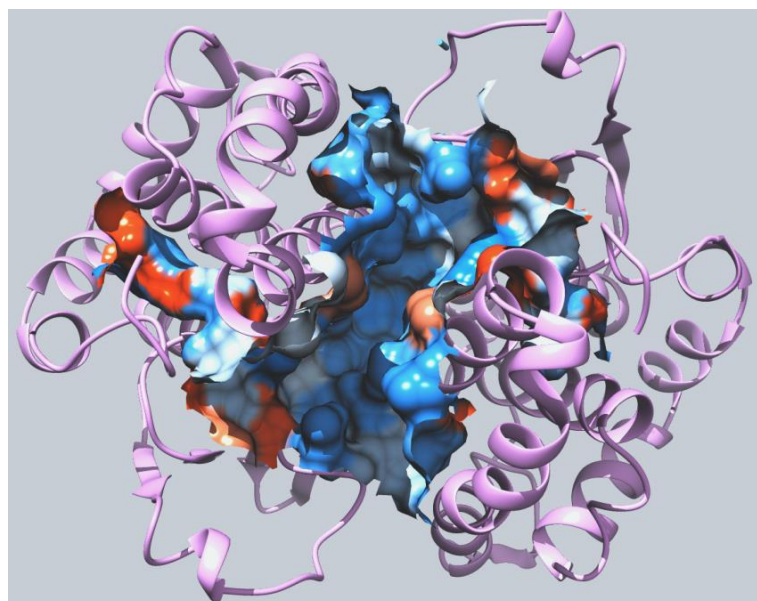
Εικόνα 5.20: Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών μελών της *pi* τάξης GSTs συγκρινόμενα με την αλληλουχία του *CdGSTP1-1* μέσω του προγράμματος ClustalW. Παρουσιάζονται τα β-ελάσματα, οι α-έλικες και οι στροφές ως βέλη, έλικες και TT, αντίστοιχα με τη χρήση του προγράμματος ESPript 3. Οι οργανισμοί καθώς επίσης και οι αριθμοί καταχώρησης στη βάση NCBI φαίνονται παρακάτω: *CdGSTP1-1-Camelus dromedarius* (AHN49805.1), *CbGSTP1-1-Camelus bactrianus* (XP_010955041), *CfGSTP1-1-Camelus ferus* (EPY87515.1), *MmGSTP1-1-Mus musculus* (NP_038569), *SsGSTP1-1-Sus scrofa* (XP_005660679), *HsGSTP1-1-Homo sapiens* (CAA30847.1).

Στην Εικόνα 5.21, παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH, καθώς επίσης και τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν. Κάποια από τα βασικά αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τη συγκεκριμένη ένωση είναι η τυροσίνη (Tyr7), η οποία αποτελεί και το καταλυτικό αμινοξύ του συγκεκριμένου ενζύμου, η φαινυλαλανίνη (Phe8), η βαλίνη (Val10), η αργινίνη (Arg13), η ισολευκίνη (Ile35), η τρυπτοφάνη (Trp38), η λυσίνη (Lys44), η γλουταμίνη (Gln51 και Gln64), η σερίνη (Ser65) και η γλυκίνη (Gly205), εκ των οποίων όλα βρίσκονται στη N-τελική περιοχή, εκτός από την γλυκίνη (Gly205), η οποία βρίσκεται στο τέλος της C-περιοχής.



Εικόνα 5.21: Τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH και των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες, ενώ τα αμινοξέα ως ράβδοι, με χρώματα ανάλογα του ατομικού τύπου.

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες σχετικά με την L-θέση σε ένζυμα GSTs τόσο της *ρi* τάξης από διάφορους οργανισμούς όσο και από άλλες τάξεις και έχει φανεί ότι αυτή η θέση διαφέρει σημαντικά και μπορεί να βρίσκεται είτε στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, όπως στην περίπτωση της GST *ρi* τάξης από χοίρο και της *tau* τάξης από σόγια (Axarli *et al.*, 2009b; Bico *et al.*, 1995), είτε μέσα στην περιοχή επαφής του διμερούς (dimer interface), είτε να επικαλύπτει μερικώς στην G- ή την H-θέση, όπως στην περίπτωση της GSTP1-1 από άνθρωπο (Perperopoulou *et al.*, 2017; Oakley *et al.*, 1999). Η ανάλυση της δομής της CdGSTP1-1 με τη χρήση του προγράμματος CASTp έδειξε ότι υπάρχει μια μεγάλη κοιλότητα, η οποία υπερκαλύπτει και την G- και την H-θέση (Εικόνα 5.22). Οι Perperopoulou *et al.*(2016), μελέτησαν την πρόσδεση της τριαζινο-χρωστικής (VBAR) παρουσία της S-εξυλ-GSH, η οποία φάνηκε να επηρεάζει την αντίδραση, ενώ η φυτοπροστατευτική ένωση eroxiconazole παρουσία της χρωστικής δεν την επηρέασε. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι δυο ενώσεις δεν ανταγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης, άρα ίσως υπάρχουν δυο L-θέσεις στο συγκεκριμένο ένζυμο (Perperopoulou *et al.*, 2016).

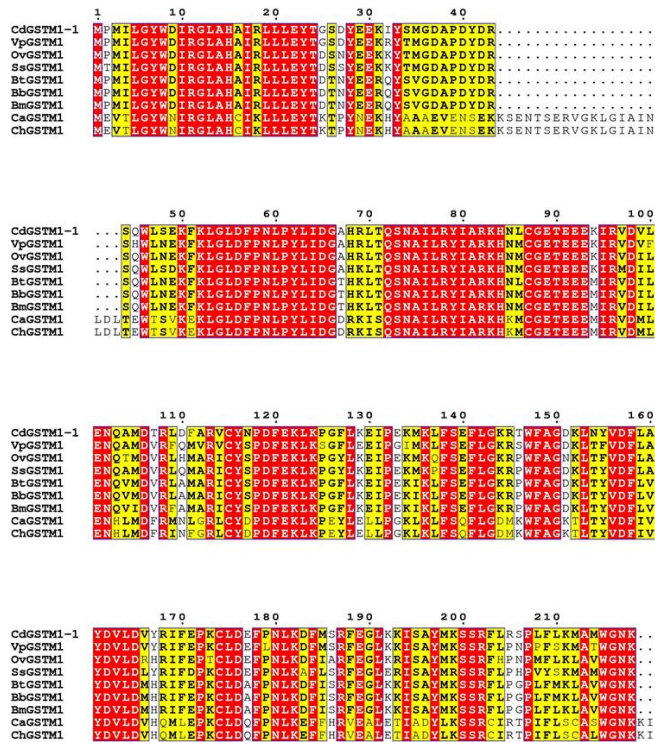


Εικόνα 5.22: Επιφάνεια της μεγάλης κοιλότητας του ενζύμου CdGSTP1-1. Η κοιλότητα απεικονίζεται με χρώματα βάσει της υδροφοβικότητας. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα CASTp.

5.3.15 Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου CdGSTM1-1 σε σύμπλοκο με την GSH και με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH

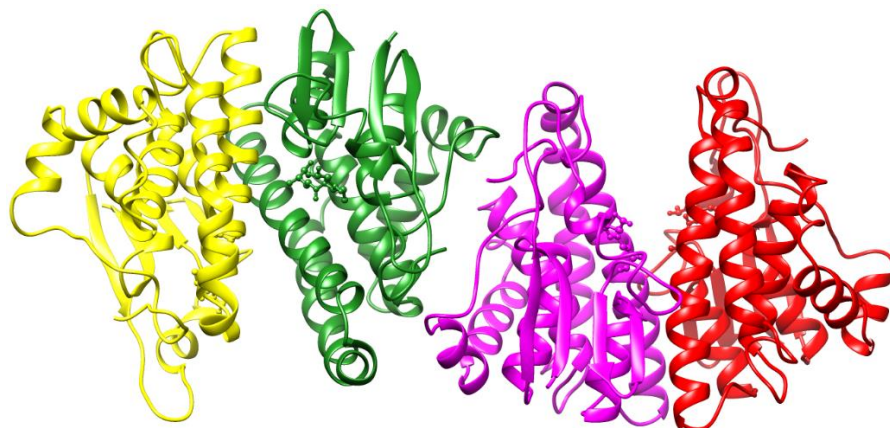
Η αμινοξική ακολουθία του ενζύμου GSTM1-1 από καμήλα φαίνεται στην Εικόνα 5.23. Η ανάλυση της δευτερογενούς δομής του ενζύμου σε σύγκριση με ομόλογες πρωτεΐνες έδειξε υψηλό βαθμό ομολογίας (Εικόνα 5.23).

Πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφία ακτίνων X για την επίλυση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου, προκειμένου να κατανοηθούν πληρέστερα οι λειτουργίες του. Ο προσδιορισμός της δομής του καθαρού ενζύμου CdGSTM1-1 τόσο με την GSH όσο και με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH έγινε μέσω κρυσταλλογραφίας περίθλασης ακτίνων X. Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Βιοτεχνολογίας Τούρκου στη Φινλανδία από την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου, με τη μέθοδο εξάτμισης της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop vapor diffusion method).



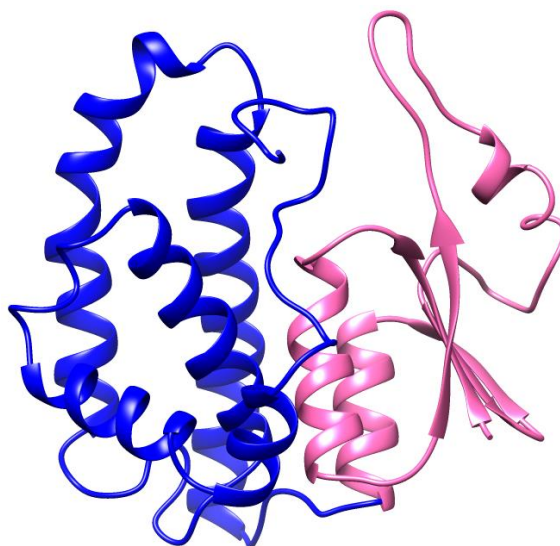
Εικόνα 5.23: Γραμμική αλληλούχιση αμινοξικών αλληλουχιών μελών της *mu* τάξης GSTs συγκρινόμενα με την αλληλουχία του *CdGSTM1-1*. Οι οργανισμοί καθώς επίσης και οι αριθμοί καταχώρησης στη βάση NCBI φαίνονται παρακάτω: *VpGSTM1-Vicugna pacos* (XP_006197481.1), *OvGSTM1-Odocoileus virginianus texanus* (XP_020724961.1), *SsGSTM1-Sus scrofa* (NP_001072152.1), *BtGSTM1-Bos taurus* (NP_787019.1), *BbGSTM1-Bubalus bubalis* (XP_006065038.1), *BmGSTM1-Bos mutus* (XP_005891359.1), *CaGSTM1-Crotalus adamanteus* (JAI13102.1), *ChGSTM1-Crotalus horridus* (JAG46689.1). Η εικόνα φτιάχτηκε με το πρόγραμμα ESPript 3.0.

Το ένζυμο *CdGSTM1-1* κρυσταλλώνεται ως τετραμερές σχηματιζόμενο από δυο ομοδιμερή (Εκόνα 5.24). Στις υπομονάδες κάθε διμερούς, προσδέεται ένα μόριο GSH.



Εικόνα 5.24: Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Κάθε υπομονάδα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η GSH αναπαρίσταται ως ράβδος. Η εικόνα σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα UCSF-Chimera.

Το κάθε μονομερές αποτελείται από 217 αμινοξέα. Σε κάθε ένα μονομερές, υπάρχουν δυο δομικές περιοχές, η N-τελική περιοχή (αμινοξέα 2-84) με τοπολογία α/β (βαβαββα) και η C-τελική περιοχή (αμινοξέα 92-212) (Εικόνα 5.25).



Εικόνα 5.25: Τρισδιάστατη δομή του μονομερούς του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Με μπλε χρώμα φαίνεται η C-τελική περιοχή, ενώ με ροζ η N-τελική περιοχή.

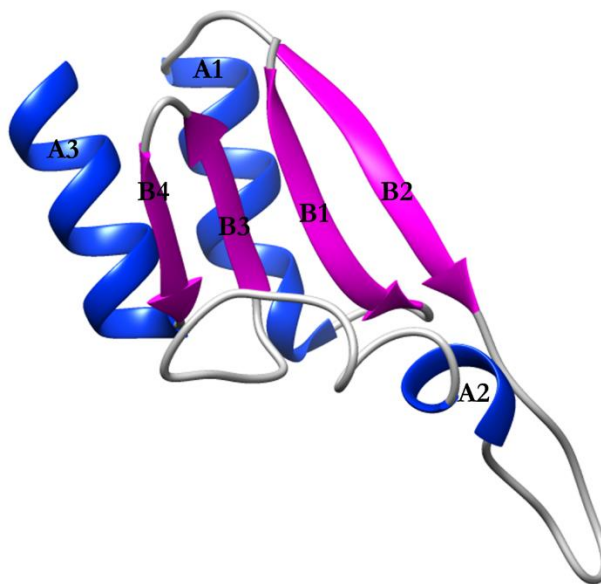
5.3.15.1 N-τελική περιοχή

Η N-τελική περιοχή αποτελείται από 3 α -έλικες, μικρού μήκους και 4 β -πτυχωτές επιφάνειες (Εικόνα 5.26). Η $\alpha 1$ -έλικα αποτελείται από 11 αμινοξέα (κατάλοιπα 13-23), η $\alpha 2$ -έλικα αποτελείται από 7 αμινοξέα (κατάλοιπα 43-49) και η $\alpha 3$ αποτελείται από 12 αμινοξέα (κατάλοιπα 72-83). Επίσης, οι β -πτυχωτές επιφάνειες είναι μικρού μήκους. Πιο συγκεκριμένα, η $\beta 1$ αποτελείται από 6 αμινοξέα (κατάλοιπα 2-7), η $\beta 2$ με 7 αμινοξέα (κατάλοιπα 26-32), η $\beta 3$ με 4 αμινοξέα (κατάλοιπα 61-64) και η $\beta 4$ με 3 αμινοξέα (κατάλοιπα 67-69). Η $\beta 3$ -πτυχωτή επιφάνεια προσανατολίζεται αντιπαράλληλα με τις υπόλοιπες πτυχωτές επιφάνειες.

Οι α -έλικες και οι β -πτυχωτές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με βρόγχους διαφόρων μηκών και ακανόνιστων σχημάτων, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου και δυνητικά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Οι βρόγχοι που συνδέουν δύο παρακείμενους β -κλώνους ονομάζονται βρόγχοι φουρκέτας (L) και το μοτίβο που δημιουργείται είναι μοτίβο β -φουρκέτας.

Η $\beta 1$ -πτυχωτή επιφάνεια συνδέεται με την $\alpha 1$ -έλικα με έναν μικρό βρόγχο 5 αμινοξέων, ενώ η $\alpha 1$ -έλικα με την $\beta 2$ -πτυχωτή επιφάνεια με 2 αμινοξέα. Η $\beta 2$ -πτυχωτή επιφάνεια συνδέεται με την $\alpha 2$ -έλικα με ένα μεσαίου μήκους βρόγχο 10 καταλοίπων. Η $\alpha 2$ -έλικα με την $\beta 3$ -πτυχωτή επιφάνεια συνδέονται με ένα βρόγχο 11 καταλοίπων. Η σύνδεση των

κλώνων $\beta 3$ και $\beta 4$ εμφανίζει το μοτίβο β -φουρκέτας (δύο κατάλοιπα). Τέλος, η πτυχωτή επιφάνεια $\beta 4$ ενώνεται με την $\alpha 3$ -έλικα με 2 κατάλοιπα μόνο.

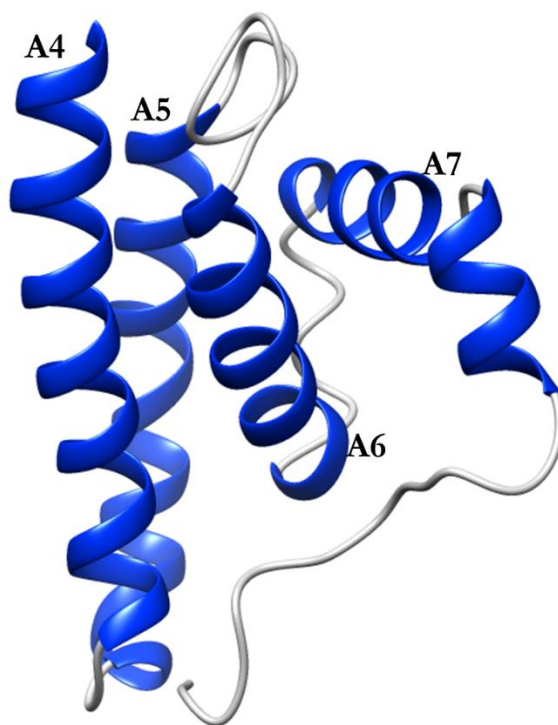


Εικόνα 5.26: Τρισδιάστατη δομή της N-τελικής περιοχής του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι α -έλικες, ενώ με μωβ παρουσιάζονται οι β -πτυχωτές επιφάνειες.

5.3.15.2 C-τελική περιοχή

Η C-τελική περιοχή είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη N-τελική δομική περιοχή και αποτελείται από τα κατάλοιπα 92 έως 212. Αποτελείται από 4 α -έλικες (Εικόνα 5.27).

Η $\alpha 4$ -έλικα αποτελείται από 24 αμινοξέα (κατάλοιπα 92-115). Η $\alpha 5$ -έλικα αποτελείται από 23 αμινοξέα (κατάλοιπα 119-141) Η $\alpha 6$ -έλικα αποτελείται από 16 αμινοξέα (κατάλοιπα 154-169) και τέλος η $\alpha 7$ -έλικα αποτελείται από 24 αμινοξέα (κατάλοιπα 172-175, 178-189 και 191-198). Η $\alpha 4$ -έλικα και η $\alpha 5$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα μικρό βρόγχο μόνο τριών καταλοίπων (116-118). Η $\alpha 5$ -έλικα με την $\alpha 6$ ενώνονται μεταξύ τους με ένα σύνδεσμο δώδεκα καταλοίπων (142-153) και τέλος η $\alpha 6$ -έλικα ενώνεται με την $\alpha 7$ -έλικα μέσω δύο μόνο καταλοίπων.



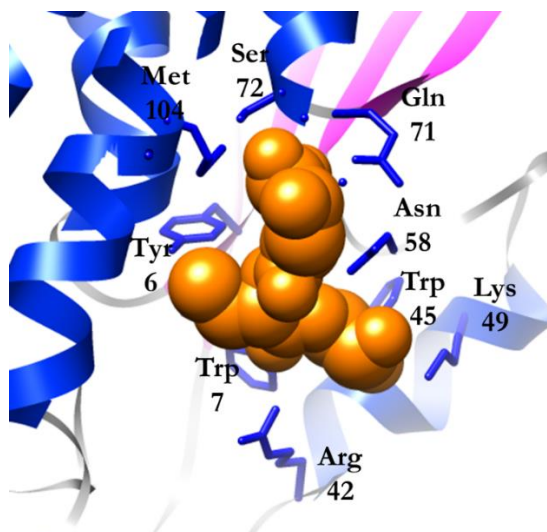
Εικόνα 5.27: Τρισδιάστατη δομή της C-τελικής περιοχής του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι α-έλικες.

5.3.15.3 G-θέση

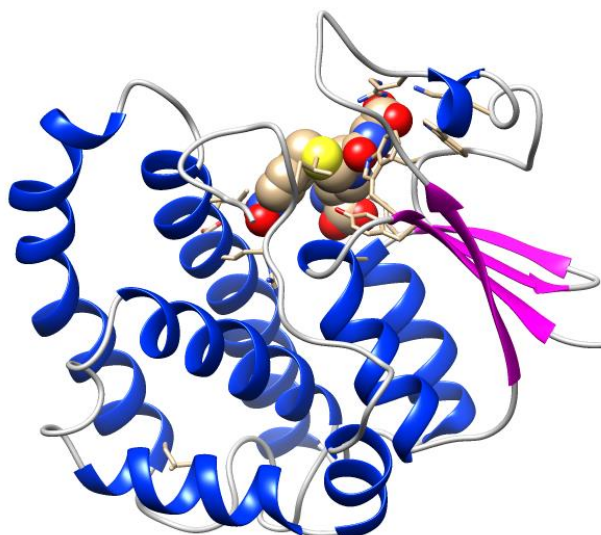
Η GSH προσδένεται στην G-θέση, η οποία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο. Αποτελείται από τα αμινοξέα 7-73. Σε κάθε μονομερές προσδένεται ένα μόριο GSH. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένα σχεδόν σε όλες τις GSTs.

Για την αναγνώριση του γ-γλουταμυλ-τμήματος της GSH είναι υπεύθυνο το μοτίβο ββα και αποτελεί τη πιο καλά συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλα τα GSTs ένζυμα (Armstrong, 1997).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.28 και 5.29, τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν κυρίως με την GSH είναι εννιά, εκ των οποίων το ένα βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και πρόκειται για την μεθειονίνη (Met104), η οποία βρίσκεται στην α4-έλικα. Τα αμινοξέα τυροσίνη (Tyr6), το οποίο είναι αι το καταλυτικό αμινοξύ και τρυπτοφάνη (Trp7) βρίσκονται στην β1-πτυχωτή επιφάνεια. Η αργινίνη (Arg42), η τρυπτοφάνη (Trp45) και η λυσίνη (Lys49) βρίσκονται στην α2-έλικα. Η ασπαραγίνη (Asn58) βρίσκεται στον βρόγχο που συνδέει την α2-έλικα με την β3-πτυχωτή επιφάνεια, ενώ η γλουταμίνη (Gln71) βρίσκεται στον βρόγχο που συνδέει την β4-πτυχωτή επιφάνεια με την α3-έλικα. Τέλος, η σερίνη (Ser72) είναι το πρώτο αμινοξύ της α3-έλικας.



Εικόνα 5.28: Τρισδιάστατη δομή της GSH και των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν. Η GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες με πορτοκαλί χρώμα, ενώ τα αμινοξέα που την συγκρατούν φαίνονται ως μπλε ράβδοι.



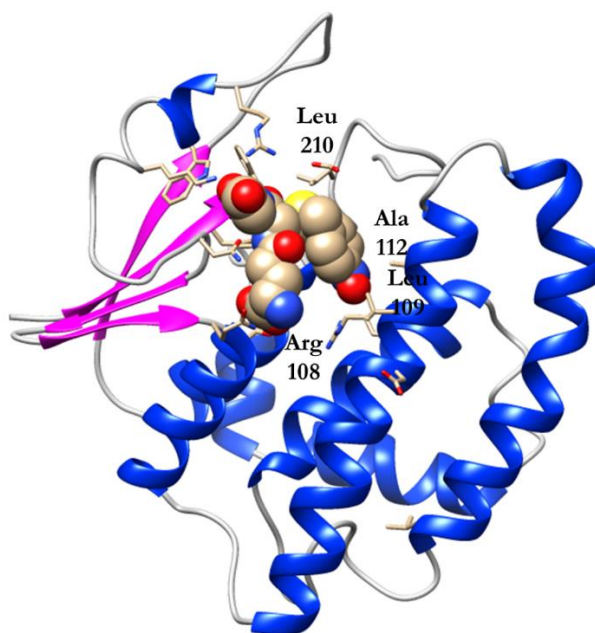
Εικόνα 5.29: Τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH και των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν στη G-θέση. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες με χρώματα σύμφωνα με τον ατομικό τύπο, ενώ τα αμινοξέα που την συγκρατούν φαίνονται ως ράβδοι.

Πίνακας 5.5: Αποστάσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου CdGSTM1-1 και της GSH. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vriend, 1990).

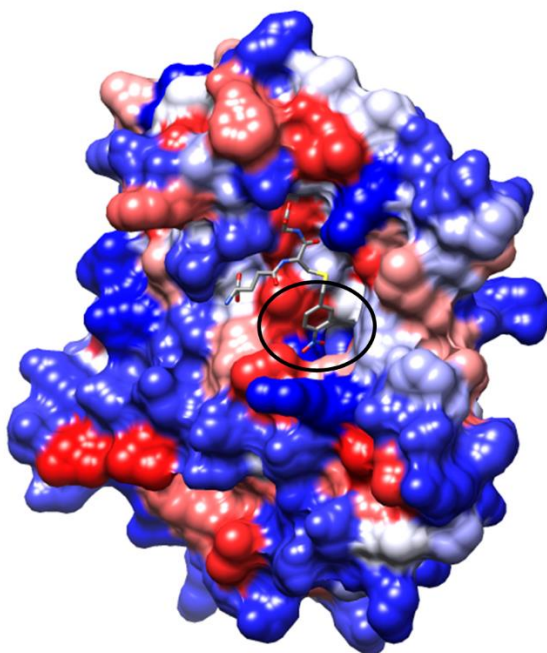
| Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) | Απόσταση (Å) | GSH (άτομο) | Τύπος αλληλεπίδρασης |
|---|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| TYR6 (OH) | 3,21 | SG2 | O[...S[] |
| TRP7 (CD1) | 3,68 | CB2 | C[...C[] |
| TRP7 (NE1) | 3,54 | CB2 | N[...C[] |
| TRP7 (NE1) | 3,17 | O2 | N[...O[] |
| LEU12 (CD1) | 3,84 | CB1 | C[...C[] |
| ARG42 (NH1) | 3,18 | O2 | N[...O[] |
| TRP45 (NE1) | 2,67 | O32 | N[...O[] |
| TRP45 (NE1) | 3,48 | C3 | N[...C[] |
| LYS49 (CD) | 3,31 | O32 | C[...O[] |
| LYS49 (CE) | 3,35 | O32 | C[...O[] |
| LYS49 (NZ) | 2,52 | O32 | N[...O[] |
| LYS49 (NZ) | 3,31 | C3 | N[...C[] |
| LYS49 (NZ) | 3,20 | O31 | N[...O[] |
| ASN58 (OD1) | 2,95 | N3 | O[...N[] |
| ASN58 (OD1) | 3,30 | C3 | O[...C[] |
| ASN58 (ND2) | 3,51 | CG1 | N[...C[] |
| LEU59 (O) | 2,65 | N2 | O[...N[] |
| LEU59 (O) | 3,42 | CG1 | O[...C[] |
| PRO60 (CD) | 3,45 | O12 | C[...O[] |
| GLN71 (CA) | 3,79 | C1 | C[...C[] |
| GLN71 (CA) | 3,39 | O12 | C[...O[] |
| GLN71 (OE1) | 3,25 | C1 | O[...C[] |
| GLN71 (OE1) | 3,09 | N1 | O[...N[] |
| GLN71 (OE1) | 3,23 | CA1 | O[...C[] |
| SER72 (N) | 3,32 | C1 | N[...C[] |
| SER72 (N) | 2,77 | O12 | N[...O[] |
| SER72 (OG) | 2,46 | O11 | O[...O[] |
| SER72 (OG) | 3,29 | C1 | O[...C[] |
| ASP105 (CG) | 3,32 | N1 | C[...N[] |
| ASP105 (OD1) | 3,24 | N1 | O[...N[] |
| ASP105 (OD2) | 2,66 | N1 | O[...N[] |
| ASP105 (OD2) | 3,41 | CA1 | O[...C[] |
| LEU209 (CD2) | 3,90 | SG2 | C[...S[] |

5.3.15.4 Η-θέση

Η Η-θέση βρίσκεται στην C-τελική περιοχή και αποτελεί θέση δέσμευσης ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Αποτελείται από τα αμινοξέα 105-210, τα οποία είναι κυρίως υδρόφοβα. Οι πλευρικές αλυσίδες αυτών των αμινοξέων χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Κάποια από τα υδρόφοβα κατάλοιπα της Η-θέσης είναι η λευκίνη (Leu109), η μεθειονίνη (Met105) και η αλανίνη (Ala112), τα οποία βρίσκονται στην α4-έλικα. Το γεγονός ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα της Η-θέσης δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα, εξηγεί την ικανότητα δέσμευσης μια ποικιλίας υποστρωμάτων (Hayes *et al.*, 2005). Στον Πίνακα 5.6, παρουσιάζονται τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με την S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αποτελεί ανάλογο υποστρώματος-προϊόντος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.30, το νιτροφαίνυλο τμήμα της ένωσης είναι δεσμευμένο σε μια υδρόφοβη σχισμή που αποτελείται από τα αμινοξέα Leu109, Arg108, Leu210, Ala112 (Εικόνα 5.31).



Εικόνα 5.30: Τρισδιάστατη δομή της S-p-νιτροβένζυλο-GSH και των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν στην Η-θέση. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως σφαίρες με χρώματα σύμφωνα με τον ατομικό τύπο, ενώ τα αμινοξέα που την συγκρατούν φαίνονται ως ράβδοι.



Εικόνα 5.31: Τρισδιάστατη δομή της μιας υπομονάδας του ενζύμου *CdGSTM1-1* και της S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Η S-p-νιτροβένζυλο-GSH αναπαρίσταται ως ράβδοι με χρώματα ανάλογα με τον ατομικό τύπο. Το ένζυμο αναπαρίσταται ως σφαίρες με χρώματα ανάλογα με την υδροφοβικότητα των αμινοξέων.

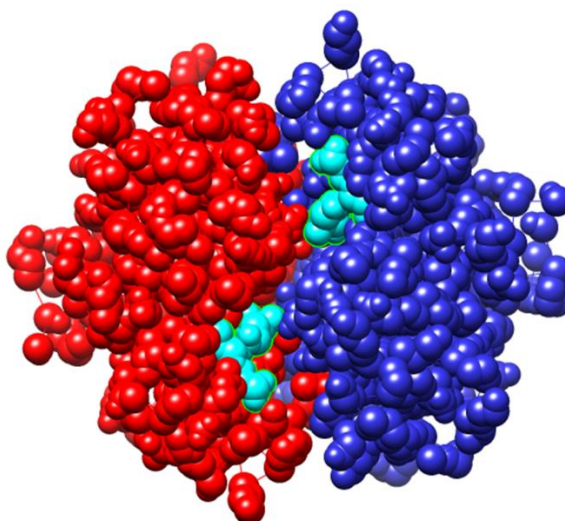
Πίνακας 5.6: Αποστάσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου *CdGSTM1-1* και της S-p-νιτροβένζυλο-GSH. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vriend, 1990).

| Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) | Απόσταση (Å) | S-p-νιτροβένζυλο-GSH (άτομο) | Τύπος αλληλεπίδρασης |
|--|--------------|------------------------------|----------------------|
| TRP8 (CD1) | 3,36 | O2 | C[...O[] |
| TRP8 (NE1) | 3,66 | C2 | N[...C[] |
| TRP8 (NE1) | 2,46 | O2 | N[...O[] |
| LEU13 (CD1) | 3,83 | C1 | C[...C[] |
| LEU13 (CD1) | 3,75 | CB1 | C[...C[] |
| LEU13 (CD1) | 3,84 | CG1 | C[...C[] |
| TRP46 (NE1) | 2,93 | O31 | N[...O[] |
| ASN59 (CG) | 3,82 | CG1 | C[...C[] |
| ASN59 (OD1) | 2,82 | CA3 | O[...C[] |
| ASN59 (ND2) | 3,70 | CG1 | N[...C[] |
| LEU60 (O) | 2,72 | N2 | O[...N[] |
| LEU60 (O) | 3,32 | CG1 | O[...C[] |
| GLN72 (CA) | 3,34 | O11 | C[...O[] |
| GLN72 (OE1) | 3,41 | C1 | O[...C[] |

| | | | |
|--------------|------|-----|----------|
| GLN72 (OE1) | 3,00 | N1 | O[...N[] |
| GLN72 (OE1) | 3,29 | CA1 | O[...C[] |
| SER73 (N) | 3,42 | C1 | N[...C[] |
| SER73 (N) | 2,75 | O11 | N[...O[] |
| SER73(OG) | 2,63 | O12 | O[...O[] |
| MET105 (CE) | 3,42 | O12 | C[...O[] |
| ASP106 (CG) | 3,45 | N1 | C[...N[] |
| ASP106 (OD2) | 2,67 | N1 | O[...N[] |
| ASP106 (OD2) | 3,37 | CA1 | O[...C[] |
| ARG108 (CD) | 3,15 | O41 | C[...O[] |
| LEU109 (CD2) | 3,25 | O41 | C[...O[] |
| ALA112 (CB) | 3,23 | O42 | C[...O[] |
| ALA112 (CB) | 3,70 | N41 | C[...N[] |
| LEU210 (CD1) | 3,67 | SG2 | C[...S[] |

5.3.15.5 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 (Hegazy *et al.*, 2004; Vargo *et al.*, 2004; Sayer *et al.*, 2000). Οι γέφυρες άλατος που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρώτης υπομονάδας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7.



Εικόνα 5.32: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς με τη μορφή σφαιρών του ενζύμου CdGSTM1-1. Η μια υπομονάδα φαίνεται με κόκκινο χρώμα, ενώ η άλλη με μπλε. Η GSH φαίνεται με γαλάζιο χρώμα.

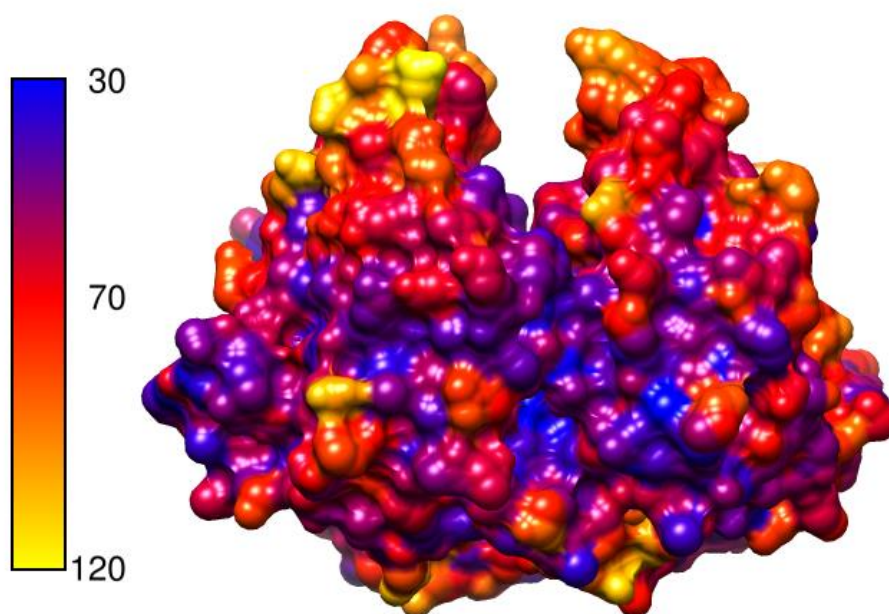
Πίνακας 5.7: Γέφυρες άλατος μεταξύ των καταλοίπων της υπομονάδας A του ενζύμου *CdGSTM1*-1. Ως μέγιστο όριο έως του οποίου παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις καθορίστηκε η απόσταση 4 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα WHAT IF (Vriend, 1990).

| Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) | Απόσταση (Å) | Αμινοξικό κατάλοιπο της υπομονάδας A (άτομο) |
|---|---------------------|---|
| GLY21 (OE1) | 2,80 | ARG201 (NH2) |
| GLY21 (OE2) | 3,31 | ARG201 (NH2) |
| GLU29 (OE1) | 3,77 | ARG17 (NH2) |
| GLU29 (OE1) | 3,06 | ARG17 (NE) |
| GLU29 (OE2) | 3,87 | ARG17 (NE) |
| ASP36 (OD1) | 2,30 | LYS210 (NZ) |
| ASP64 (OD1) | 3,85 | LYS82 (NZ) |
| ASP64 (OD2) | 2,98 | LYS82 (NZ) |
| GLU88 (OE2) | 3,71 | LYS151 (NZ) |
| GLU100 (OE1) | 3,42 | ARG77 (NH2) |
| GLU100 (OE1) | 2,67 | ARG77 (NE) |
| GLU100 (OE2) | 2,79 | ARG77 (NH2) |
| GLU100 (OE2) | 3,55 | ARG77 (NE) |
| ASP109 (OD1) | 2,62 | ARG112 (NH2) |
| ASP109 (OD2) | 3,56 | LYS133 (NZ) |
| ASP118 (OD2) | 3,61 | LYS121 (NZ) |
| GLU129 (OE1) | 3,98 | LYS133 (NZ) |
| ASP161 (OD1) | 2,74 | ARG10 (NH2) |
| ASP161 (OD1) | 3,43 | ARG10 (NE) |
| ASP161 (OD2) | 2,96 | ARG107 (NH1) |
| ASP161 (OD2) | 2,57 | ARG107 (NH2) |
| ASP164 (OD2) | 3,02 | ARG10 (NH1) |
| ASP164 (OD2) | 3,01 | ARG10 (NH2) |
| ASP164 (OD1) | 2,69 | ARG167 (NH1) |
| ASP164 (OD1) | 3,76 | ARG167 (NE) |
| ASP175 (OD1) | 2,62 | LYS181 (NZ) |
| GLU188 (OE2) | 3,07 | ARG167 (NH1) |
| GLU188 (OE2) | 3,31 | ARG167 (NH2) |

5.3.15.6 Δομική ευελιξία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.20, ο παράγοντας B αποτελεί έναν συντελεστή, ο οποίος εκφράζει την ευελιξία του ενζύμου. Οι μεγάλες τιμές του παράγοντα B υποδεικνύουν μεγαλύτερη κινητικότητα των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, ενώ όσο μικρότερη είναι αυτή η τιμή τόσο πιο άκαμπτο είναι το μόριο (Yuan *et al.*, 2003).

Σύμφωνα με την Εικόνα 5.33, το ένζυμο *CdGSTM1-1* φαίνεται να μην παρουσιάζει υψηλή ευελιξία. Η μεγαλύτερη επιφάνεια του ενζύμου αποτελείται από αμινοξέα που είναι σχετικά άκαμπτα, δηλαδή φαίνεται να έχουν χαμηλές με μέτριες τιμές παράγοντα B. Πολύ λίγα αμινοξέα φαίνεται να έχουν έναν υψηλό παράγοντα B, τα οποία βρίσκονται στον βρόγχο που ενώνει την β2 πτυχωτή επιφάνεια με την α2 έλικα (θέσεις 35-40).

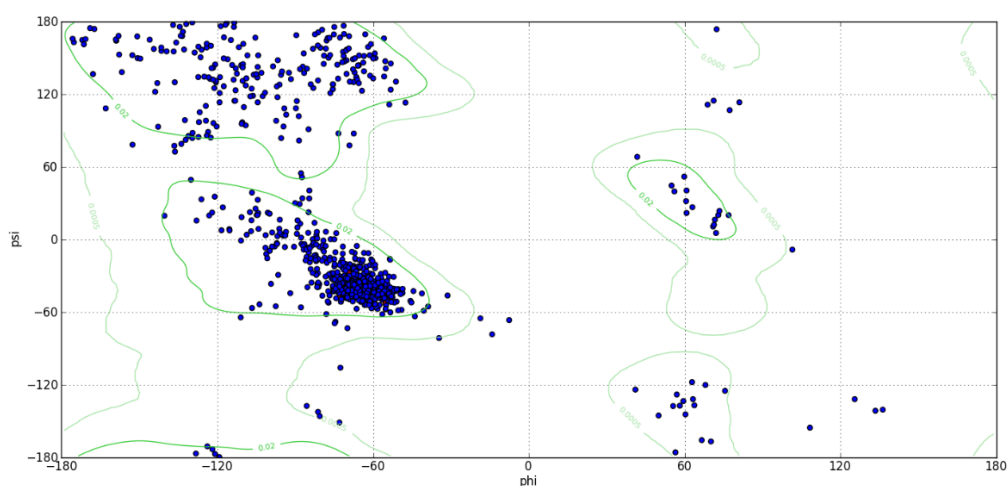


Εικόνα 5.33: Τρισδιάστατη δομή του διμερούς με τη μορφή σφαιρών του ενζύμου *CdGSTM1-1*. Οι υπομονάδες απεικονίζονται σύμφωνα με τον παράγοντα B. Τα άτομα με τον μικρότερο παράγοντα B παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, ενώ με τον μεγαλύτερο παράγοντα B με κίτρινο, οι υπόλοιποι χρωματισμοί αποτελούν ενδιάμεσες τιμές του παράγοντα. Το πρόγραμμα UCSF Chimera χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών του παράγοντα B και την δημιουργία της εικόνας.

5.3.15.7 ϕ και ψ διέδρες γωνίες του πεπτιδικού σκελετού – Ramachandran Διάγραμμα

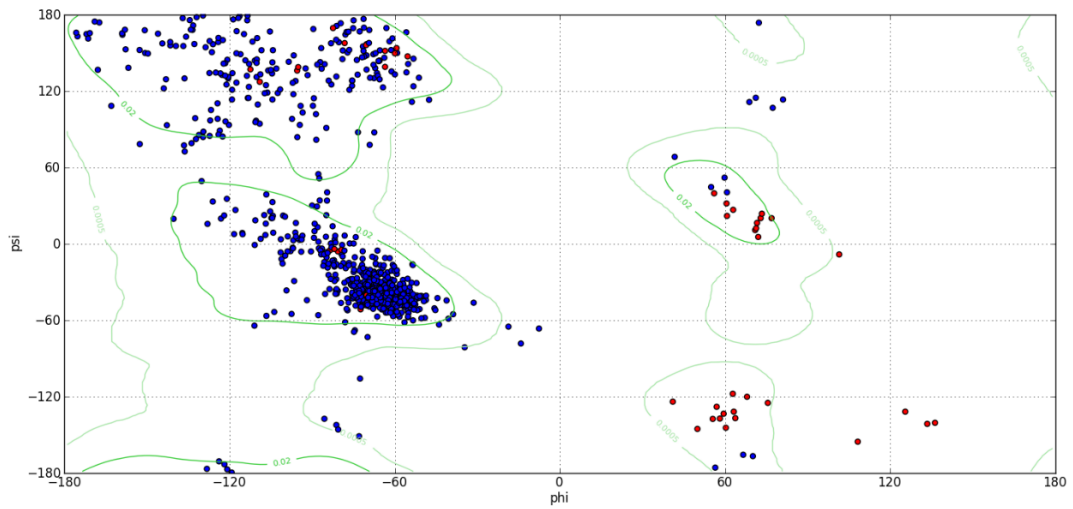
Το Ramachandran διάγραμμα οπτικοποιεί τη διανομή των αμινοξέων στις δομές των πρωτεϊνών, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.20. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει τις επιτρεπτές και τις λιγότερο επιτρεπτές περιοχές.

Όσον αφορά στο ένζυμο *CdGSTM1-1*, φαίνεται ότι τα περισσότερα αμινοξέα βρίσκονται γύρω από τις στερεοδιαταξικά επιτρεπτές περιοχές (Εικόνα 5.34). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το πρόγραμμα RAMPAGE, το 94,8 % των αμινοξέων βρίσκονται στις ευνοϊκές περιοχές, το 3,4 % βρίσκονται σε επιτρεπτές περιοχές και τέλος μόνο το 1,9 % βρίσκονται σε μη ευνοϊκές περιοχές.



Εικόνα 5.34: Διάγραμμα Ramachandran για το ένζυμο *CdGSTM1-1*. Τα αμινοξικά κατάλοιπα εμφανίζονται ως μπλε κουκίδες. Οι ευνοϊκές και οι επιτρεπτές περιοχές εμφανίζονται με πράσινο περίγραμμα.

Εξαίρεση από την αρχή της ομαδοποίησης γύρω από τις περιοχές α -έλικας και β -πτυχωτής επιφάνειας αποτελεί το κατάλοιπο γλυκίνης. Το γεγονός ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ δεν έχει σύνθετη πλευρική αλυσίδα, του επιτρέπει μεγαλύτερη ευκαμψία και άρα ένα πιο ευρύ φάσμα στερεοδιατάξεων απ' ό,τι τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Έτσι, η γλυκίνη βρίσκεται συχνά σε περιοχές βρόγχων, όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα κάνει μια απότομη στροφή και αποτελεί ένα εξαιρετικά συντηρημένο κατάλοιπο, αφού η παρουσία των στροφών σε συγκεκριμένες θέσεις είναι συχνά χαρακτηριστικό της πρωτεϊνικής δομής. Στην Εικόνα 5.35, φαίνονται τα κατάλοιπα γλυκίνης τα οποία όπως προαναφέρθηκε συχνά δεν ομαδοποιούνται όπως τα υπόλοιπα αμινοξέα.



Εικόνα 5.35: Διάγραμμα Ramachadran για το ένζυμο *CdGSTM1-1*. Τα αμινοξικά κατάλοιπα εμφανίζονται ως μπλε κουκίδες. Τα κατάλοιπα γλυκίνης εμφανίζονται ως κόκκινες κουκίδες. Οι επιτρεπτές περιοχές εμφανίζονται με πράσινο περίγραμμα.

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλές στρατηγικές, προκειμένου να προστατευθούν από διάφορες τοξικές ξеноβιοτικές ενώσεις, άλλα και από τις Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS). Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς είναι η ενζυμική αποτοξίνωση της Φάσης II, στην οποία συμμετέχουν οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Οι καμήλες (*Camelus dromedarius*) ζουν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους υπό αντίξοες συνθήκες λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και της έντονης ξηρασίας της αραβικής ερήμου. Έτσι, είναι εκτεθειμένες σε πολλούς εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, που προκαλούν βλάβη σε σημαντικά βιομόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ένζυμα της Φάσης II της αποτοξίνωσης και ειδικότερα οι GSTs έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι συμβάλλουν στην προστασία των οργανισμών από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση (Malik *et al.*, 2016).

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, μελετήθηκαν δυο ένζυμα της *pi* και *mu* τάξης GST από καμήλα, το *CdGSTP1-1* και το *CdGSTM1-1*. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη έναντι πιθανών υποστρωμάτων, προκειμένου να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα τους, μελετήθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους ως προς τα δυο πρότυπα υποστρώματα, μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα τους, καθώς επίσης και η ικανότητα τους να δεσμεύουν μόρια που δεν αποτελούν υποστρώματα. Επιπλέον, όσον αφορά στο *CdGSTP1-1*, μελετήθηκε η σημαντικότητα του ιξώδους αλλά και του pH στο καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης, καθώς επίσης μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ενώ για το *CdGSTM1-1* μελετήθηκε ο τρόπος αναστολής του από το μυκητοκτόνο zoxium zoxamide. Τέλος, χαρακτηρίστηκε η δομή και των δυο ενζύμων, στην περίπτωση του P1-1 μέσω μοντελοποίησης, ενώ του M1-1 μέσω κρυσταλλογραφίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρόλο που τα δυο ένζυμα προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό, εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στην αμινοξική τους αλληλουχία (Εικόνα 5.36), στην συγγένεια ως προς τα υποστρώματα αλλά και στην θερμοσταθερότητα τους.

Όσον αφορά στα κινητικά χαρακτηριστικά τους, τα δυο ένζυμα υπακούουν το πρότυπο κινητικής του Michaelis-Menten, όμως το *CdGSTM1-1* εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια και ως προς τα δυο υποστρώματα σε σύγκριση με το *CdGSTP1-1*. Ωστόσο, ενώ η παράμετρος K_m για την GSH του *CdGSTP1-1* είναι πολύ κοντά με αυτή του GSTP1 από άνθρωπο (Georgakis *et al.*, 2017), η ίδια τιμή ως προς το CDNB είναι περίπου 6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το αντίστοιχο ένζυμο από άνθρωπο (Zimniak *et al.*, 1994). Από

την άλλη μεριά, η τιμή K_m του *CdGSTM1-1* ως προς το CDNB είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του ίδιου ενζύμου από άνθρωπο (Georgakis *et al.*, 2017).

Η μελέτη της θερμοσταθερότητας των δυο ενζύμων πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικούς τρόπους, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν συγκρίσιμα. Τα δυο ένζυμα από καμήλα δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη θερμοσταθερότητα, παρόλο που θα αναμενόταν υψηλή τιμή T_m , λόγω των συνθηκών διαβίωσης τους. Ωστόσο, μελέτη του ενζύμου *CdGSTK1-1* επιβεβαιώνει την χαμηλή θερμοσταθερότητα των ενζύμων του συγκεκριμένου οργανισμού (Malik *et al.*, 2016).

Κανένα από τα δυο ένζυμα δεν εμφάνισε μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων που δεν λειτουργούν ως υποστρώματα. Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει ότι ο σημαντικότερος τους ρόλος περιορίζεται στην αποτοξίνωση του οργανισμού και όχι στην αποθήκευση ή μεταφορά άλλων μορίων, όπως έχει φανεί ότι πολλές GSTs πραγματοποιούν (Chronopoulou *et al.*, 2017).

Όσον αφορά στην επίδραση των κινητικών παραμέτρων του *CdGSTP1-1* από το ιξώδες και το pH, φάνηκε ότι το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με τις δομικές αναδιατάξεις της πρωτεΐνης (Labrou *et al.*, 2016). Επίσης, η μελέτη θερμικής αδρανοποίησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες υπέδειξε διφασική κινητική με άμεση απενεργοποίηση που εμφανίζεται αμέσως και αργή απενεργοποίηση που συνεχίζεται περισσότερο.

Το *CdGSTM1-1* έδειξε να αναστέλλεται πλήρως από το μυκητοκτόνο Zoxium zoxamide, το οποίο ύστερα από τη μελέτη που έγινε φάνηκε ότι συναγωνίζεται το υπόστρωμα CDNB για την ίδια θέση δέσμευσης, ενώ ως προς την GSH εμφανίζει μικτό τύπο αναστολής. Η συγκεκριμένη ένωση μελετήθηκε και ως προς την επίδραση που έχει στη θερμοσταθερότητα του ενζύμου με τη μέθοδο DSF, αφού έχει φανεί ότι η πρόσδεση ενώσεων στα ένζυμα αυξάνουν την θερμοσταθερότητα τους (Niesen *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα, ωστόσο, έδειξαν ότι η παρουσία ακόμα και μικρής συγκέντρωσης της ένωσης επηρεάζουν αρνητικά τη θερμοσταθερότητα, καθιστώντας το ένζυμο περισσότερο ασταθές. Αντίθετα, η πρόσδεση GSH ή S-hexyl-GSH στο ένζυμο ενισχύει την θερμοσταθερότητα του, αυξάνοντας την τιμή T_m .

Τέλος, η μελέτη της δομής των δυο ενζύμων έδειξε ότι και τα δυο έχουν την κλασσική GST δομή. Ωστόσο, η μελέτη της κρυσταλλογραφίας του *CdGSTM1-1* παρέχει περισσότερες και πιο εξειδικευμένες πληροφορίες για την δομή του ενζύμου. Πιο ειδικά, η μελέτη των τιμών του παράγοντα B υποδεικνύουν ένα ένζυμο με χαμηλή ευελιξία. Επίσης,

το διάγραμμα Ramachadran δείχνει ότι η πλειονότητα των αμινοξέων βρίσκονται σε επιτρεπτές περιοχές και όχι σε περιοχές που δεν ευνοούνται.

```

CdGSTP1-1      1  M P F Y T I V Y F P V R G R C E A M R M L L A D Q D Q S W K E E V V T M E T W P A L K P S . . . . . C L Y G Q
CdGSTM1-1      1  . M P M I L G Y W D I R C L A H A I R L L E Y T G S D Y E E K I Y S M G D A P D Y D R S Q W L S E K F K L G L D F P N
consensus>50   . . P . . . . Y . . ! R G . . . A . R $ L L . . . . . E . ! . M . . . P . . . . S . . . . . % . #

CdGSTP1-1     51  L P K F Q D G D L T L Y Q S N A I L R H L G R S L G L Y G K D Q Q E A A L L D V V N D G V E D L R C K Y V T L I Y T . N
CdGSTM1-1     60  L P Y L I D G A H R L T Q S N A I L R Y I A R K H N L C G E T E E E K I R V D V L E N Q A M D T R L D F A R V C Y N P D
consensus>50   L P . . . D G . . . L . Q S N A I L R . . . R . . . L . G . . # E . . . . D V . # . . . D . R . . % . . . . Y . . #

CdGSTP1-1     110 Y E A G K E G Y V K A L P E H L K P F E T L L S Q N Q G G Q A F I V G N Q I S F A D Y N L L D L L L N H Q V L A P G C L
CdGSTM1-1     120 F E K L K P G F L K E I P E K M K L F S E F L G . . . . K R T W F A G D K L N Y V D F L A Y D V L D V Y R I F E P K C L
consensus>50   % E . . K . G % . K . . P E . $ K . F . . . L . . . . . G # . . . % . D % . . . D . L . . . ! . . P . C L

CdGSTP1-1     170 D S F P L L S A Y V A R L S A R P K L K A F L A S P E H V K R P I N G N G K Q . . . .
CdGSTM1-1     176 D E F P L L K D F M S R F E G L K K I S A Y M K S S R F L R S P L F L K M A M W G N K
consensus>50   D . F P . L . . % . . R . . . . K . . A % $ . S . . . . . P . . . . .

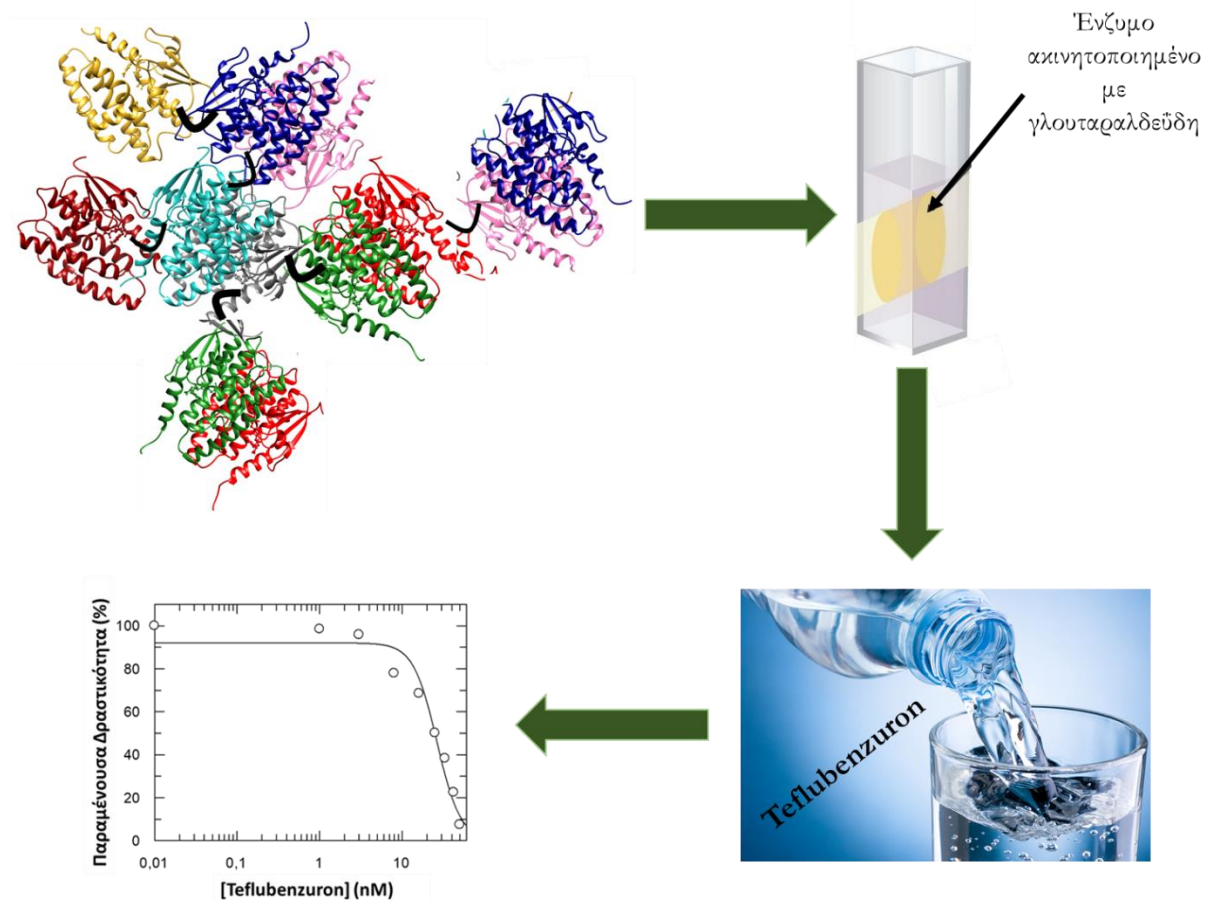
```

Εικόνα 5.36: Αμινοξική αλληλούχιση των ενζύμων *CdGSTP1-1* και *CdGSTM1-1*, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ESPript 3.0.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δίνουν την ευκαιρία να κατανοηθεί ο τρόπος μηχανισμού και προσαρμογής της καμήλας σε συνθήκες ερήμου. Επίσης, η φυλογενετική ανάλυση αλλά και οι δομικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν εξηγούν ως έναν βαθμό την ποικιλομορφία και την εξέλιξη των GSTs του υπό μελέτη οργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ teflubenzuron ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ *PvGSTU2-2.1*



6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι GSTs είναι πολυλειτουργικά ένζυμα, των οποίων ο σημαντικότερος ρόλος είναι η αποτοξίνωση του οργανισμού (Shen *et al.*, 2015). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της κατάλυσης της πρόσδεσης της γλουταθειόνης με τοξικούς παράγοντες. Έτσι, αφενός μειώνεται η δραστικότητα και τοξικότητα αυτών των παραγόντων και αφετέρου αυξάνεται η διαλυτότητα τους, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται από τον οργανισμό (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017; Chronopoulou *et al.*, 2014b). Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν την ενζυμική μηχανική, με σκοπό να δημιουργήσουν ένζυμα με βελτιωμένες ιδιότητες. Οι GSTs χάρη στην δομή τους είναι ενδιαφέροντες στόχοι για την ενζυμική μηχανική. Στην βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλά παραδείγματα ενζυμικής μηχανικής των GSTs. Για παράδειγμα, η μετατροπή του αμινοξέος σερίνη του ενεργού κέντρου σε σελενοκυστεΐνη οδήγησε στην δημιουργία μιας GST με αυξημένη δράση περοξειδάσης (Zheng *et al.*, 2008). Επίσης, η αντικατάσταση του σημαντικού αμινοξέος μεθειονίνη (Met212) με κυστεΐνη και στη συνέχεια η τροποποίηση της θειόλης της κυστεΐνης με συγκεκριμένα αντιδραστήρια οδήγησε στην κατασκευή ενός ημισυνθετικού ενζύμου GSTM2-2, το οποίο εμφάνιζε διαφορετικά καταλυτικά χαρακτηριστικά εξαρτώμενα από τον υποκαταστάτη της θειόλης (Norrgård *et al.*, 2011). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αλλαγές στην Η-θέση δίνουν πολύ ενδιαφέροντα ένζυμα, όπως στην περίπτωση της hGSTA1-1, στην οποία η Axarli και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένα καταλυτικά χαρακτηριστικά καθώς επίσης και αυξημένη θερμική σταθερότητα σε σχέση με το πατρικό ένζυμο (Axarli *et al.*, 2017). Όσον αφορά στις φυτικές GSTs, είναι επίσης πολύ μελετημένες λόγω της συνεισφοράς τους στην αποτοξίνωση διάφορων φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Οι Dixon *et al.* δημιούργησαν με κατευθυνόμενη ενζυμική εξέλιξη (DNA Shuffling) μια βιβλιοθήκη χμαιοκτικών ενζύμων, από τα οποία κάποια εμφάνισαν 19 φορές μεγαλύτερη αποτοξινωτική δράση ως προς το ζιζανιοκτόνο fluorodifen σε σχέση με το πατρικό ένζυμο (Dixon *et al.*, 2003). Σε μια άλλη εργασία, χρησιμοποιώντας κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση (site-directed mutagenesis) αποδείχτηκε ότι το αμινοξύ αργινίνη στη θέση 111 του ενζύμου GSTU4-4 από *Glycine max* καθορίζει την εκλεκτικότητα ως προς τα ξενοβιοτικά υποστρώματα (Labrou *et al.*, 2016).

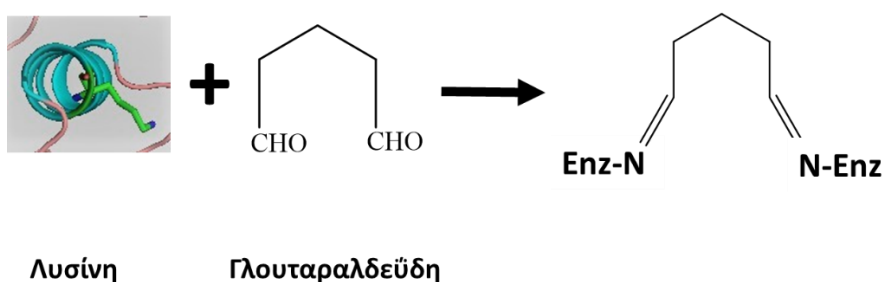
Μια πολύ σημαντική εφαρμογή των GSTs είναι η κατασκευή βιοαισθητήρων, ικανών να ανιχνεύουν διάφορες τοξικές ενώσεις τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των συγκεκριμένων ενζύμων να καταλύουν την πρόσδεση της γλουταθειόνης με τέτοιες ενώσεις. Υπάρχουν αρκετές έρευνες που αφορούν αυτόν τον

τομέα και περιγράφουν την κατασκευή βιοαισθητήρων χρησιμοποιώντας GSTs για την ανίχνευση διάφορων τοξικών ουσιών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κατασκευή ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του ζιζανιοκτόνου molinate σε περιβαλλοντικά δείγματα (Oliveira *et al.*, 2013). Επίσης, μελετήθηκε η κατασκευή ενός ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του εντομοκτόνου malathion με τη χρήση του μεταλλαγμένου ενζύμου GST I της φι τάξης από καλαμπόκι (Kapoli *et al.*, 2008). Ο Materon και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν ένα ηλεκτρόδιο με ακινητοποιημένη GST για την ανίχνευση αντικαρκινικών φαρμάκων (Materon *et al.*, 2014). Τελευταία, έχουν αναπτυχθεί ενζυμικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στην αναστολή του ενζύμου είτε παρουσία είτε απουσία του αναστολέα (Amine *et al.*, 2006; Justino *et al.*, 2015).

Σε έναν ενζυμικό βιοαισθητήρα, ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες είναι η ακινητοποίηση του ενζύμου (Wang *et al.*, 2014; Pagan *et al.*, 2015), δηλαδή η σταθεροποίηση των βιομορίων σε συγκεκριμένη θέση και με συγκεκριμένο τρόπο. Τα ένζυμα είναι ακριβά και αυτό το κόστος αυξάνεται, αφού πρόκειται για εξαιρετικά ευαίσθητα προϊόντα, τα οποία μπορούν να μετουσιωθούν εύκολα από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το pH (Franssen *et al.*, 2013). Η ακινητοποίηση των ενζύμων είναι ο πιο εύκολος τρόπος, προκειμένου να ξεπεραστούν οι προαναφερθέντες περιορισμοί (Van de Velde *et al.*, 2002). Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται η σταθερότητα και η επαναχρησιμοποίηση του βιοαισθητήρα (Mohamad *et al.*, 2015). Ουσιαστικά, η ακινητοποίηση μιμείται το φυσικό περιβάλλον των ενζύμων, τα περισσότερα των οποίων βρίσκονται προσδεμένα είτε στην κυτταρική μεμβράνη είτε σε διάφορα οργανίδια (Homaei *et al.*, 2013). Η ακινητοποίηση μπορεί να επιτευχθεί είτε με φυσική μέθοδο (προσρόφηση, εγκαυλλίωση, εγκλωβισμός σε πολυμερές) είτε με χημική (ομοιοπολικός δεσμός ή διαμοριακό πλέγμα) ή ακόμα και με συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων (Bhardwaj, 2015; Sassolas *et al.*, 2012; Homaei *et al.*, 2013).

Στο παρόν κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση με τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο γλουταραλδεϋδη. Πρόκειται για ένα διλειτουργικό αντιδραστήριο, το οποίο παρουσία πρωτεϊνών έχει την ικανότητα να πολυμερίζεται (Thongnuanchan *et al.*, 2018). Η γλουταραλδεϋδη αντιδρά συνήθως με τα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, κυρίως με την λυσίνη. Το αμινοξύ λυσίνη συνήθως βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης, εξαιτίας της πολικότητας της αμινομάδας και έτσι με την πρόσδεση της γλουταραλδεϋδης δεν επηρεάζεται η καταλυτική της δράση (Migneault *et al.*, 2004). Ωστόσο, δεν έχει ακόμα πλήρως διασαφηνιστεί η δομή που λαμβάνει το προϊόν ενζύμου-γλουταραλδεϋδης κατά την ακινητοποίηση (Barbosa *et*

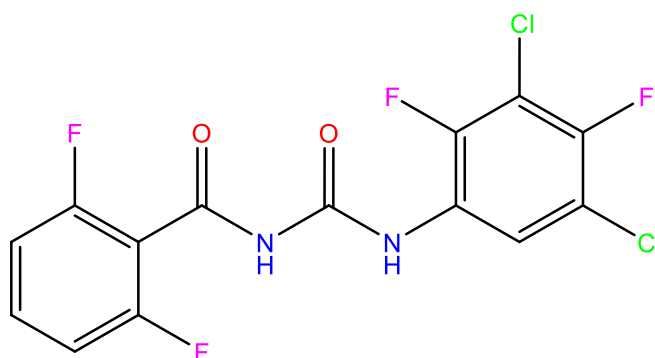
al., 2014). Επιπλέον, η γλουταραλδεΐδη δεν έχει μόνο έναν μηχανισμό δράσης με τις πρωτεΐνες και αυτό οφείλεται στις διαφορετικές δομές που λαμβάνει ανάλογα με το pH. Υπό όξινες ή ουδέτερες συνθήκες, οι αλδεϋδομάδες της γλουταραλδεΐδης αντιδρούν με τις πρωτεΐνες με το σχηματισμό βάσης Schiff, δηλαδή πραγματοποιείται νουκλεόφιλη προσβολή της ε-αμινομάδας της λυσίνης από την γλουταραλδεΐδη (Εικόνα 6.1) (Karamitros & Labrou, 2016). Στις περιπτώσεις που η πρωτεΐνη δεν έχει πολλές λυσίνες στην επιφάνειά της, τότε χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί κάποια αδρανής πρωτεΐνη, που να έχει υψηλή πυκνότητα σε επιφανειακά αμινοξέα λυσίνης, όπως είναι η αλβουμίνη μόσχου (BSA) (Barbosa *et al.*, 2014).



Εικόνα 6.1: Μηχανισμός ακινητοποίησης ενός ενζύμου με τη χρήση γλουταραλδεΐδης σε όξινες ή ουδέτερες συνθήκες (σχηματισμός βάσης Schiff). Στο κατάλοιπο λυσίνης, με μπλε φαίνεται η αμινομάδα.

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση του μεταλλαγμένου φυτικού ενζύμου PnGSTU2-2.1 με τη χρήση γλουταραλδεΐδης, με σκοπό την ανάπτυξη μιας μεθόδου ανίχνευσης του εντομοκτόνου teflubenzuron σε δείγματα νερού.

Η επιλογή του teflubenzuron έγινε κατόπιν μελέτης της αλληλεπίδρασής του με το ένζυμο PnGSTU2-2.1, που φάνηκε ότι εμφανίζει υψηλή αναστολή (Κεφάλαιο 4), καθώς επίσης λαμβάνοντας υπόψιν ότι αποτελεί περιβαντολλογικό στόχο λόγω της τοξικότητας στο υδάτινο περιβάλλον. Πρόκειται για μια μεγάλη μοριακού βάρους ένωση (381,108 g/mol), η οποία αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους, ο ένας εκ των οποίων φέρει δυο μόρια φθορίου και ο άλλος δυο μόρια φθορίου και δυο μόρια χλωρίου (Εικόνα 6.2). Το χημικό της όνομα κατά IUPAC είναι N-[3,5-διχλωρο-2,4-διφθοροφαινυλ]καρβαμοϋλ]-2,6-διφθοροβενζαμίδιο.



Εικόνα 6.2: Δομή του εντομοκτόνου teflubenzuron.

Το teflubenzuron ανήκει στις βενζυλουρίες (Ware & Whitacre, 2004) και χρησιμοποιείται τόσο στην γεωπονία όσο και στην κτηνιατρική ως εντομοκτόνο (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91734>). Τα κυριότερα χαρακτηριστικά της είναι η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και η μεγάλη ικανότητα προσρόφησης από διάφορα υλικά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιζημάτων (Tucca *et al.*, 2016; Ernst *et al.*, 2001).

Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης ένωσης έγκυται αφενός στο γεγονός ότι παρέχει μακροπρόθεσμο έλεγχο των εντόμων (Malinowski & Pawinska, 1992) και αφετέρου στον τρόπο δράσης της έναντι των εντόμων. Ειδικότερα, προκαλεί αναστολή της σύνθεσης της χιτίνης, γεγονός που προκαλεί ρήξη της επιδερμίδας και στη συνέχεια θάνατο (Meng *et al.*, 2018; Fogel *et al.*, 2016). Παρά το γεγονός ότι δε θεωρείται εξαιρετικά τοξικό για τα ψάρια και τα φύκη, μπορεί να έχει επιπτώσεις σε διάφορα είδη που δεν αποτελούν στόχο του, όπως τα καρκινοειδή και τα αμφίποδα (Macken *et al.*, 2015) και εμφανίζει μεγάλη διάρκεια ζωής. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί σε ίζημα κάτω από ιχθυοκαλλιέργειες για αρκετούς μήνες και ο χρόνος ημιζωής του έχει υπολογιστεί σε 115-170 ημέρες (Samuelsen, 2016; Samuelsen *et al.*, 2015). Λόγω του γεγονότος ότι δεν είναι πολύ υδατοδιαλυτό, υπάρχει δυσκολία στην αποικοδόμησή του, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με πλύσεις με θαλασσινό νερό, είτε με χημικό τρόπο, είτε με τη χρήση μικροοργανισμών, είτε με επαναιώρησή του σε οργανικά υλικά ή με συνδυασμό των προαναφερθέντων (Samuelsen, 2016; Finkelstein *et al.*, 2001). Ταχεία αποικοδομησή του έχει παρατηρηθεί στο έδαφος και στις εκβολές ποταμών (Hsiao *et al.*, 2013; Marsella *et al.*, 2000).

6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 Βιολογικά υλικά και λοιπά αντιδραστήρια

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου PnGSTU2-2, το PnGSTU2-2.1. Κατόπιν μελέτης του ενζύμου PnGSTU2-2.1 και λαμβάνοντας υπόψιν την υψηλή του ενζυμική δραστικότητα, καθώς επίσης και την μεγάλη θερμοσταθερότητα που εμφανίζει, επιλέχθηκε για την κατασκευή του βιοαισθητήρα. Η έκφραση, ο καθαρισμός και η περαιτέρω μελέτη του ενζύμου περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.2.

Η γλουταραλδεΐδη (25 % v/v) που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν της εταιρείας Merck. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.1.3.

6.2.2 Ακίνητοποίηση του ενζύμου PnGSTU2-2.1 χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΐδη

Πραγματοποιήθηκε ακίνητοποίηση του ενζύμου με γλουταραλδεΐδη σε συνδυασμό με αλβουμίνη μόσχου (BSA), μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών. Στον Πίνακα 6.1, παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου, αλβουμίνης και γλουταραλδεΐδης που χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ακίνητοποίηση.

Πίνακας 6.1: Συνθήκες ακίνητοποίησης που δοκιμάστηκαν.

| | Γλουταραλδεΐδη (% v/v) | BSA (mg) | Ένζυμο (U) |
|-----------|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 0,5 | 15 | 3 |
| 2 | 0,5 | 15 | 6 |
| 3 | 0,5 | 20 | 3 |
| 4 | 0,5 | 20 | 6 |
| 5 | 0,5 | 30 | 3 |
| 6 | 0,5 | 30 | 6 |
| 7 | 1 | 15 | 3 |
| 8 | 1 | 15 | 6 |
| 9 | 1 | 20 | 3 |
| 10 | 1 | 20 | 6 |
| 11 | 1 | 30 | 3 |
| 12 | 1 | 30 | 6 |

Αφού αναμίχθηκε η γλουταραλδεΐδη, η BSA και το ένζυμο σε κυψελίδα των 4 mL, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7 μέχρι τελικό όγκο 200 μ L και αφέθηκαν στο πλαϊ στους 4°C για 24 h, προκειμένου να στερεοποιηθεί το μίγμα. Μετά το πέρας των 24 h, έγινε πλύση τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5, για να απομακρυνθούν προϊόντα τα οποία δεν είχαν στερεοποιηθεί. Η ενζυμική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου μελετήθηκε με τις ίδιες συνθήκες που μελετάται το ελεύθερο ένζυμο (2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, 37°C), με τη διαφορά ότι ο τελικός όγκος στη κυψελίδα ήταν 3 mL. Επίσης, η μέτρηση ήταν συνεχής για 20 min, σε αντίθεση με το ελεύθερο ένζυμο, του οποίου η μέτρηση πραγματοποιείται για 2 min.

6.2.3 Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 3 mL που περιείχαν τα εξής:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **GSH:** 2,5 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **CDNB:** 0,4 – 2,4 mM

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.2.14 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (CDNB). Η διαφορά ήταν ότι οι ποσότητες ήταν τριπλάσιες και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε για 20 min.

Οι αρχικές ταχύτητες στην αντίδραση που καταλύει η GST με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν στους 37°C σε δείγματα με τελικό όγκο 3 mL και περιείχαν:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:** 0,1 M, pH 6,5
- **CDNB:** 1 mM (σταθερή συγκέντρωση)
- **GSH:** 0,75 - 4 mM

Πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί ενζυμικής δραστηριότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.2.14 με

σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων (όπως αναφέρονται ανωτέρω), εκτός του μεταβαλλόμενου υποστρώματος (GSH). Η διαφορά ήταν ότι οι ποσότητες ήταν τριπλάσιες και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε για 20 min.

6.2.4 Υπολογισμός του IC_{50} για την ένωση teflubenzuron με ακινητοποιημένο ένζυμο

Ύστερα από τη σάρωση με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα με το ελεύθερο ένζυμο PnGSTU2-2.1 (Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.12), το εντομοκτόνο teflubenzuron μελετήθηκε περαιτέρω λόγω της αναστολής που προκαλούσε. Έτσι, επιλέχθηκε να μελετηθεί και ως προς το ακινητοποιημένο ένζυμο.

Για τον υπολογισμό του IC_{50} , πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.2.14 με σταθερές τις συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του μεταβαλλόμενου αναστολέα. Συγκεκριμένα, ύστερα από την εισαγωγή του αναστολέα και του διαλύματος, το μίγμα επωαζόταν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα γινόταν μέτρηση της δραστηριότητας για 20 min. Η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου PnGSTU2-2.1 υπολογίστηκε υπό την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοπροστατευτικού teflubenzuron με ένα εύρος τιμών από 0,01 – 50 nM.

6.2.5 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου και έλεγχος της επαναληψιμότητας της

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,01-50 nM) στην δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου και δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη. Έπειτα, προκειμένου να εξεταστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια των μετρήσεων, επιλέχθηκε μια συγκέντρωση του εντομοκτόνου κοντά στην τιμή του IC_{50} και πραγματοποιήθηκαν πέντε μετρήσεις με τις ίδιες συνθήκες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 25 nM του εντομοκτόνου.

Τέλος, με σκοπό να εξεταστεί για ακόμα μια φορά η ακρίβεια του ακινητοποιημένου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε το πείραμα του "Προστιθέμενου και Αναμενόμενου". Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν κάποιες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Το αποτέλεσμα της μέτρησης συγκρίθηκε με το αποτέλεσμα που αποκτήθηκε από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

6.2.6 Ανίχνευση του εντομοκτόνου *teflubenzuron* σε δείγματα νερού

Για τον προσδιορισμό του εντομοκτόνου σε δείγματα νερού, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του *teflubenzuron* (0 - 75 nM), το οποίο ήταν διαλυμένο σε (α) νερό βρύσης από το δίκτυο της Αθήνας και (β) μεταλλικό νερό "ΑΥΡΑ". Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δυο πρότυπες καμπύλες.

6.2.7 Μέτρηση της χρονικής διάρκειας της σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Προκειμένου να μελετηθεί η χρονική διάρκεια σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης μορφής στη διάρκεια εννέα μηνών. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου, έχοντας τις ίδιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, οι δυο μορφές του ενζύμου παρέμειναν στους 4°C και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5.

6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1 Ακίνητοποίηση του ενζύμου PnGSTU2-2.1 χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΐδη

Μετά το πέρας των 24 h και τις πλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 6.2.2, μελετήθηκε η δραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης.

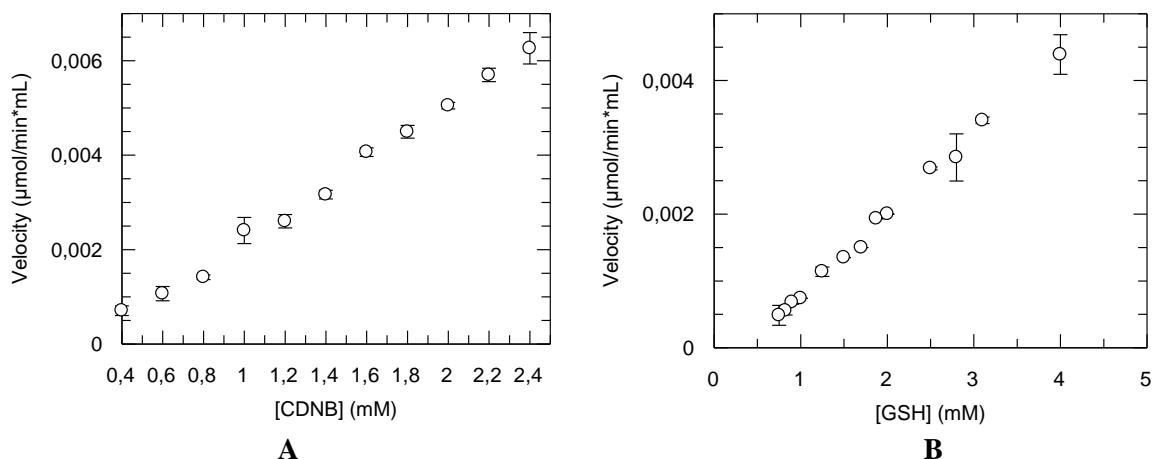
Πίνακας 6.2: Δραστικότητα (U/mL) του ακινητοποιημένου ενζύμου στις διαφορετικές συνθήκες.

| | Ενζυμική δραστικότητα (U/mL) |
|-----------|---|
| 1 | 0,025 |
| 2 | 0,018 |
| 3 | 0 |
| 4 | 0,014 |
| 5 | 0,0125 |
| 6 | 0,01 |
| 7 | 0,008 |
| 8 | 0,001 |
| 9 | 0,008 |
| 10 | 0,014 |
| 11 | 0,0028 |
| 12 | 0,017 |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.2, οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης ήταν 0,5 % v/v γλουταραλδεΐδη, 15 mg BSA και 3 U ενζύμου (συνθήκη 1).

6.3.2 Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου ως προς τα υποστρώματα CDNB και GSH

Αφού το ένζυμο PnGSTU2-2.1 ακινητοποιήθηκε επιτυχώς μέσω του σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών με το αντιδραστήριο γλουταραλδεΐδη και την αλβουμίνη, μελετήθηκε η κινητική του συμπεριφορά. Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και για τα δυο υποστρώματα CDNB και GSH. Στην Εικόνα 6.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα δυο υποστρώματα.

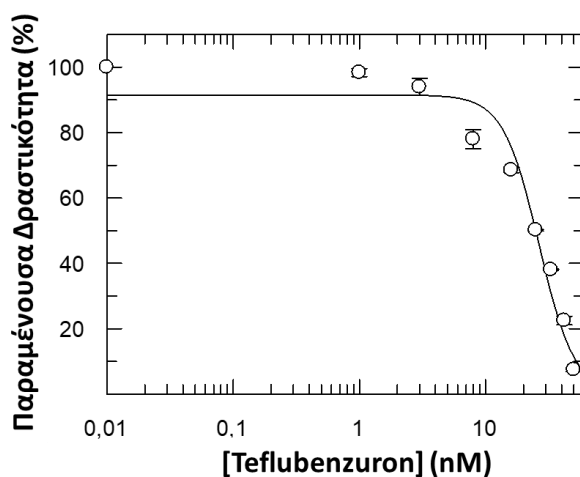


Εικόνα 6.3: Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου *PvGSTU2-2.1* (**A**) με το CDNB ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και την GSH σε σταθερή συγκέντρωση 2,5 mM, (**B**) με την GSH ως υπόστρωμα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης και το CDNB σε σταθερή συγκέντρωση 1 mM.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται πως η ακινητοποιημένη μορφή του ενζύμου δε φτάνει στις συνθήκες του πειράματος σε κορεσμό, δείχνοντας να έχει μικρή συγγένεια με τα δυο υποστρώματα.

6.3.3 Υπολογισμός του IC_{50} για την ένωση *teflubenzuron* με ακινητοποιημένο ένζυμο

Έχοντας ακινητοποιήσει το ένζυμο, σκοπός ήταν να μελετηθεί η αναστολή που επιφέρει το εντομοκτόνο στην ακινητοποιημένη μορφή. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές δοκιμές παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα. Στην Εικόνα 6.4, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της παραμένουσας δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου έναντι της συγκέντρωσης του αναστολέα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η τιμή IC_{50} είναι $26,4 \pm 2,5$ nM.

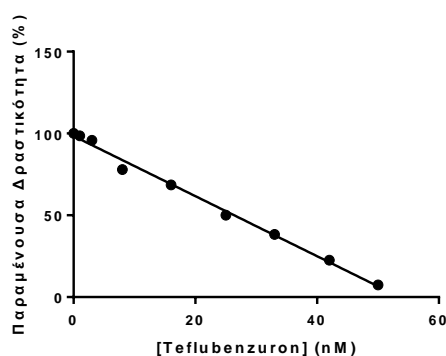


Εικόνα 6.4: Καμπύλη συγκέντρωσης-παραμένουσας δραστηριότητας για το εντομοκτόνο *teflubenzuron*. Όλες οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH και είναι ο μέσος όρος δυο επαναλήψεων. Η τιμή IC_{50} είναι $26,4 \pm 2,5$ nM.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο εντομοκτόνο είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας της ακινητοποιημένης μορφής του ενζύμου PnGSTU2-2.1.

6.3.4 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου και έλεγχος της επαναληψιμότητας

Η μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου με διαφορετικές συγκεντρώσεις του teflubenzuron έδειξε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση με R^2 99,61 %. Η πρότυπη ευθεια παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.5.



Εικόνα 6.5: Γραμμική εξάρτηση της παραμένουσας δραστηριότητας έναντι της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου teflubenzuron.

Η εξίσωση που προκύπτει από το γράφημα της Εικόνας 6.5 είναι η εξής:

$$y = -5,17 * 10^{-5}x + 0,0028$$

Όπου, y είναι η δραστηριότητα που βρέθηκε και x είναι η αναμενόμενη συγκέντρωση του αναστολέα. Στον Πίνακα 6.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που βρέθηκαν για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.

Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα από το πείραμα "Προστιθέμενου και Αναμενόμενου".

| [Teflubenzuron] (nM) | |
|----------------------------|-------------------------|
| Συγκέντρωση που προστέθηκε | Συγκέντρωση που βρέθηκε |
| 5 | 4,6 |
| 15 | 15,5 |
| 30 | 30,9 |
| 40 | 41,1 |

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.3 φανερόνουν την αξιοπιστία της πρότυπης καμπύλης, αφού οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν φαίνεται να μην έχουν μεγάλη απόκλιση από αυτές που πραγματικά προστέθηκαν.

Στη συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις σε συγκεκριμένη συγκέντρωση του αναστολέα κοντά στην τιμή IC₅₀ (25 nM). Στον Πίνακα 6.4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

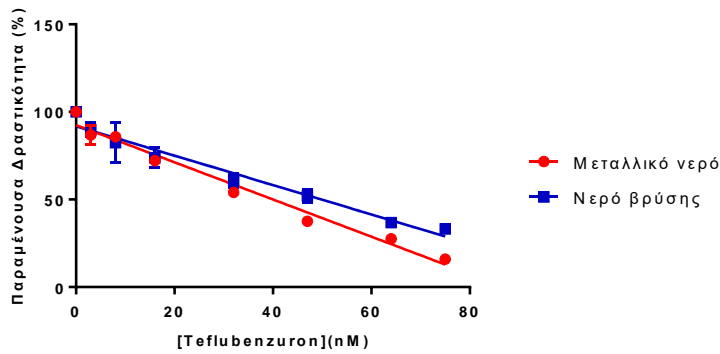
Πίνακας 6.4: Επαναλήψεις στη συγκέντρωση 25 nM του teflubenzuron.

| Επανάληψη | Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$) |
|----------------------|--|
| 1^η | 0,000177 |
| 2^η | 0,000183 |
| 3^η | 0,00017 |
| 4^η | 0,000186 |
| 5^η | 0.000175 |
| Μέσος όρος | 0,000178 \pm 0,000008 |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.4, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των πέντε επαναλήψεων της ίδιας συγκέντρωσης.

6.3.5 Ανίχνευση του εντομοκτόνου teflubenzuron σε δείγματα νερού

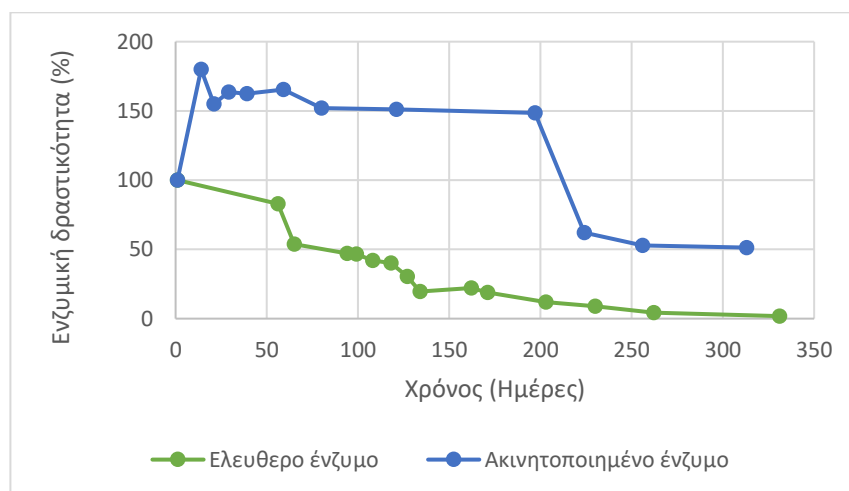
Προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου να ανιχνεύει το εντομοκτόνο, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε δείγματα νερού βρύσης και μεταλλικού νερού με γνωστές συγκεντρώσεις του αναστολέα. Τα αποτελέσματα έδειξαν γραμμική εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα με R² 98 % για το μεταλλικό νερό και 98,8 % για το νερό βρύσης (Εικόνα 6.6).



Εικόνα 6.6: Πρότυπες καμπύλες για το teflubenzuron σε δείγματα νερού βρύσης και μεταλλικού νερού.

6.3.6 Μέτρηση της χρονικής διάρκειας της σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Τέλος, μελετήθηκε η σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε συνάρτηση με τον χρόνο στους 4°C, έχοντας ως μέτρο σύγκρισης την σταθερότητα του ελεύθερου ενζύμου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 6,5. Στην Εικόνα 6.7, παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου ενζύμου έναντι του χρόνου.



Εικόνα 6.7: Συγκριτικό διάγραμμα της ενζυμικής δραστηκότητας του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου ενζύμου έναντι του χρόνου.

6.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν την σύζευξη της GSH με ξеноβιοτικές τοξικές ενώσεις, τα καθιστά ένζυμα με μεγάλο ενδιαφέρον για την κατασκευή βιοαισθητήρων (Perperopoulou *et al.*, 2017). Ειδικότερα, τα ένζυμα, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα καθώς επίσης και υψηλή αναστολή με κάποια συγκεκριμένη φυτοπροστατευτική ένωση, όπως το μεταλλαγμένο ένζυμο PnGSTU2-2.1, είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την ανίχνευση της συγκεκριμένης ένωσης σε περιβαλλοντικά δείγματα. Έτσι, στο παρόν κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ανάπτυξης ενός βιοαισθητήρα με το ένζυμο PnGSTU2-2.1, ώστε να ανιχνεύεται το ζιζανιοκτόνο teflubenzuron σε δείγματα νερού. Η επιλογή του συγκεκριμένου ενζύμου ήταν η υψηλή δραστηριότητά του και η εξαιρετικά μικρή τιμή IC₅₀ έναντι της συγκεκριμένης φυτοπροστατευτικής ένωσης (Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.14).

Για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα, ήταν αρχικά αναγκαίο να ακινητοποιηθεί το ένζυμο, ώστε να είναι πιο σταθερό και επαναχρησιμοποιούμενο. Η ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με το πολυδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΰδη, το οποίο δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με το ένζυμο με τη βοήθεια αλβουμίνης. Η ομοιοπολική σύνδεση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, ιδιαίτερα με τα πολυμερή ένζυμα, αφού προλαμβάνει την διάσπαση των υπομονάδων μέσω της διασταυρούμενης σύνδεσης μεταξύ των υπομονάδων (Karamitros & Labrou, 2016). Αυτό το πλεονέκτημα παίζει σημαντικό ρόλο στις GSTs, αφού έχει αποδειχθεί ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα, στην πλειοψηφία τους, πρέπει να είναι διμερή για να είναι αποτελεσματικά στην κατάλυση (Wu & Dong, 2012). Η συγκεκριμένη μέθοδος ακινητοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για την ακινητοποίηση της λακάσης (Franssen *et al.*, 2013). Επιπλέον, η γλουταραλδεΰδη έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με χιτοζάνη από την ερευνητική ομάδα του Gröger, προκειμένου να ακινητοποιήσουν την R-οξυνιτριλάση (Gröger *et al.*, 2001). Αρχικά, χρησιμοποίησαν μόνο γλουταραλδεΰδη, όμως η δραστηριότητα του ενζύμου μειώθηκε πολύ, έτσι όταν την συνδύασαν με τον συγκεκριμένο πολυσακχαρίτη, τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά (Gröger *et al.*, 2001).

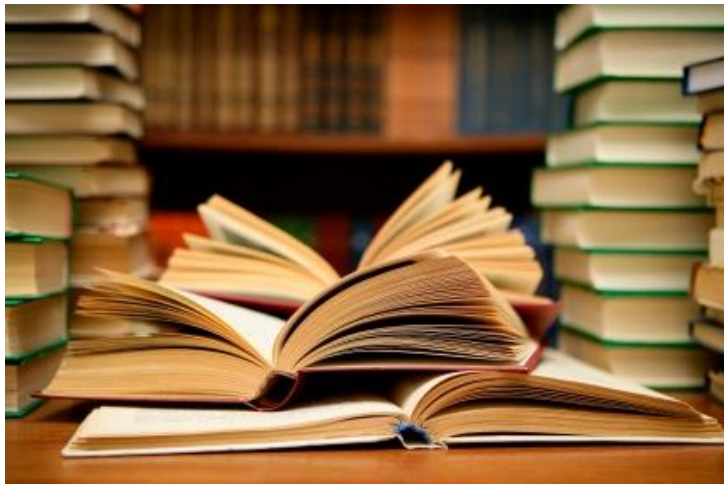
Ύστερα από την επιτυχή ακινητοποίηση, μελετήθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά της ακινητοποιημένης μορφής του ενζύμου, αφού έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ακινητοποίηση μπορεί να επιφέρει αρκετές αλλαγές στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα τα ακινητοποιημένα ένζυμα να εμφανίζουν τελείως διαφορετική καταλυτική συμπεριφορά (Mateo *et al.*, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι τις περισσότερες φορές τα ακινητοποιημένα ένζυμα εμφανίζουν μικρότερη δραστηριότητα και αρκετά μεγαλύτερη τιμή

στη σταθερά Michaelis, εξαιτίας της δυσκολίας στην πρόσβαση του υποστρώματος (Homaei *et al.*, 2013). Πράγματι, η κινητική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην ακινητοποιημένη μορφή έδειξε μειωμένη συγγένεια, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα κινητικά χαρακτηριστικά του ελεύθερου ενζύμου (Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.6).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση του αναστολέα που επιφέρει μείωση 50 % της αρχικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά εντυπωσιακά αφού η τιμή αυτή ήταν 26,4 nM. Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection-LOD) στους βιοαισθητήρες φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος αντίδρασης μεταξύ ενζύμου και αναστολέα κ.α (Amine *et al.*, 2006). Αυτό ίσως εξηγεί την πολύ μικρότερη τιμή IC₅₀ σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Κεφάλαιο 4, Παράγραφος 4.3.14). Ωστόσο, έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες το ακινητοποιημένο ένζυμο να εμφανίζει πολύ μικρή τιμή IC₅₀, όπως στην περίπτωση του αμπερομετρικού βιοαισθητήρα, ο οποίος κατασκευάστηκε για την ανίχνευση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (Ciucu *et al.*, 2003). Ακολούθως, εξετάστηκε η επαναληψιμότητα των μετρήσεων καθώς επίσης και η αξιοπιστία της πρότυπης καμπύλης. Τα αποτελέσματα ήταν και στις δυο περιπτώσεις πολύ ικανοποιητικά, αφού δεν υπήρχε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των τιμών. Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα της ακινητοποιημένης μορφής να ανιχνεύει το συγκεκριμένο εντομοκτόνο σε δείγματα νερού. Τέλος, το πιο σημαντικό στοιχείο σε μια ακινητοποίηση είναι η διάρκεια ζωής της. Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκε η χρονική διάρκεια σταθερότητας της ακινητοποιημένης μορφής του ενζύμου, σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο φυτικό ένζυμο PnGSTU2-2.1 είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα, ο οποίος ανιχνεύει το εντομοκτόνο teflubenzuron σε πολύ μικρές ποσότητες και σε περιβαλλοντικά δείγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



- Abel E., Bammler T.K., Eaton D.L. (2004) Biotransformation of Methyl Parathion by Glutathione S-transferases. *Toxic. Sci.* 79, 224-232
- Aceto A., Caccuri A.M., Sacchetta P., Bucciarelli T., Dragani B., Rosato N., Federici G., Di Ilio C. (1992) Dissociation and unfolding of Pi-class glutathione transferase. *Biochem. J.* 285, 241–245
- Adang A.E.P., Brussee J., Gen A.V.D., Mulder G.J. (1990) The glutathione-binding site in glutathione S-transferases: Investigation of the cysteinyl, glycyl and γ -glutamyl domains. *Biochem. J.* 269, 47-54
- Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pincus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R., Davis R.J., Ronai Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18, 1321–1334
- Ahmad L., Rylott E.L., Bruce N.C., Edwards R., Grogan G. (2016) Structural evidence for Arabidopsis glutathione transferase *AtGSTF2* functioning as a transporter of small organic ligands. *FEBS Open Bio.* 7: 122–132
- Ahmad S., Thulasingama M., Palombob I., Daley D.O., Johnsonc K.A., Morgensternd R., Haeggström J.Z., Rinaldo-Matthis A. (2015) Trimeric microsomal glutathione transferase 2 displays one third of the sites reactivity. *BBA- Prot. and proteome.* 1854:10A, 1365-1371
- Alias Z. (2016) The role of glutathione transferases in the development of insecticide resistance. *Insecticides resistance.* <http://dx.doi.org/10.5772/61972>
- Allan J.M., Wild C.P., Rollinson S., Willett E.V., Moorman A.V., Dovey G.J., Roddam P.L., Roman E., Cartwright R.A., Morgan G.J. (2001) Polymorphism in glutathione S-transferase P1 as associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukaemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 11592-11597
- Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. (2009) Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75
- Alnaes G.I.G., Ronneberg J.A., Kristensen V.N., Tost J. (2015) Heterogeneous DNA Methylation Patterns in the GSTP1 Promoter Lead to Discordant Results between Assay Technologies and Impede Its Implementation as Epigenetic Biomarkers in Breast Cancer. *Genes* 6(3), 878-900
- Alonso-Lomillo M.A., Dominguez-Renedo O., Arcos-Martinez M.J. (2009) Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors. *Bioelectrochemistry.* 74, 306–309
- Al-Swailem A.M., Shehata M.M., Abu-Duhier F.M., Al-Yamani E.J., Al-Busadah K.A., Al-Arawi M.S., Al-Khider A.Y., Al-Muhaimeed A.N., Al-Qahtani F.H., Manee M.M., Al-Shomrani B.M., Al-Qhtani S.M., Al-Harthi A.S., Akdemir K.C., Inan M.S., Out H.H. (2010) Sequencing, analysis, and annotation of expressed sequence tags for *Camelus dromedaries*. *PLoS One* 5(5), e10720
- Ames B.N., Profet M., Gold L.S. (1990) Nature's chemicals and synthetic chemicals: Comparative toxicology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7782-7786

- Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G. (2006) Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectr.* 21, 1405-1423
- Andreou V.G., Clonis Y.D. (2002) Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *An. Chem. Acta* 460, 151-161
- Ansari S.A., Husain Q. (2012) Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotech. Adv.* 30, 512-523
- Aranda E. (2016) Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with *Ascomycota* fungi. *Curr. Op. Biotech.* 38:1-8
- Arbildi P., Turell L., López V., Alvarez B., Fernández V. (2017) Mechanistic insights into EgGST1, a Mu class glutathione S-transferase from the cestode parasite *Echinococcus granulosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 633, 15-22
- Armstrong R.N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18
- Armstrong R.N. (2010) Glutathione transferases, In *Comprehensive Toxicology* (2nd edn) (Guengerich, F.P., ed.), 295–321, Els. Sci.
- Armstrong R.N., Morgenstern R., Board P.G. (2018) 10.16: Glutathione transferases. Reference Module in Biomedical Sciences. *Comprehensive Toxicology* (Third Edition) 10, 326–362
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* (Oxford, England), 22, 195–201
- Arora P.K., Bae H. (2014) Role of dehalogenases in aerobic bacterial degradation of chlorinated aromatic compounds. *J. Chem.* 2014, 1-10
- Arts I.S., Vertommen D., Baldin F., Laloux G., Collet J-F. (2016) Comprehensively characterizing the thioredoxin interactome *in vivo* highlights the central role played by this ubiquitous oxidoreductase in redox control. *Mol. Cell Prot.* 15.6, 2125-2140
- Arts I.S., Vertommen D., Baldin F., Laloux G., Collet J-F. (2016) Comprehensively characterizing the thioredoxin interactome *in vivo* highlights the central role played by this ubiquitous oxidoreductase in redox control. *Mol. Cell. Prot.* 15, 2125-2140
- Asgher M., Per T.S., Anjum S., Khan M.I.R., Masood A., Verma S., Khan N.A. (2017) Contribution of glutathione in heavy metal stress tolerance in plants. Springer Nature Singapore Pte Ltd. M.I.R. Khan, N.A. Khan (eds.), *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*, doi 10.1007/978-981-10-5254-5_12
- Ashkenazy H, Penn O, Doron-Faigenboim A, Cohen O, Cannarozzi G, Zomer O, Pupko T. 2012 FastML: a web server for probabilistic reconstruction of ancestral sequences *Nucleic Acids Res.* 40(Web Server issue): W580-4

- Atkinson H.J., Babbitt P.C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochem.* 48, 11108–11116
- Awasthi S.K., Mishra N., Dixit S.K., Singh A., Yadav M., Yadav S.S., Rathaur S. (2009) Short report: Antifilarial activity of 1,3-diarylpropen -1-one: effect on glutathione S-transferase, a phase II detoxification system. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80(5), 764-768
- Awasthi Y.C., Ramana K.V., Chaudhary P., Srivastava S.K., Awasthi S. (2017) Regulatory roles of glutathione S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. *Free Rad. Biol. Med.* 111, 235-243
- Axarli I., Dhavala P., Papageorgiou A.C., Labrou N.E. (2009a) 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.* 385, 984–1002
- Axarli I., Dhavala P., Papageorgiou A.C., Labrou N.E. (2009b) Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the *Tau* class glutathione transferases. *Biochem. J.* 422, 247-256
- Axarli I., Georgiadou C., Dhavala P., Papageorgiou A.C., Labrou N.E. (2010) Investigation of the role of the conserved residues Ser13, Asn48 and Pro49 in the catalytic mechanism of the tau class glutathione transferase from *Glycine max*. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 662-667
- Axarli I., Muleta A.W., Chronopoulou E.G., Papageorgiou A.C., Labrou N.E. (2017) Directed evolution of glutathione transferases towards a selective glutathione-binding site and improved oxidative stability. *BBA-Gen Sub.* 1861, 3416–3428
- Azevedo C.C., Guzmán-Guillén R., Martins J.C., Osório H., Vasconcelos V., da Fonseca R.R., Campos A. (2015) Proteomic profiling of gill GSTs in *Mytilus galloprovincialis* from the North of Portugal and Galicia evidences variations at protein isoform level with a possible relation with water quality. *Mar. Envir. Res.* 110, 152-161
- Bahadir E.B., Sezgintürk M.K. (2015) Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental and bioterror/biowarfare analyses. *An. Biochem.* 478, 107-120
- Bai Y., Luo Q., Zhang W., Miao L., Xu J., Li H., Liu J. (2013) Highly ordered protein nanorings designed by accurate control of glutathione S-transferase self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10966–10969
- Balogh L.M., Atkins W.M. (2011) Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal. *Drug Met. Rev.* 43(2), 165-178
- Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. (2014) Gluteraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* 4, 1583-1600
- Barnes M.M., James S.P., Wood P.B. (1959) Formation of mercapturic acid and the levels of glutathione in tissues. *Formation of mercapturic acid* 71, 680-690
- Basantani M., Srivastava A. (2007) Plant glutathione transferases: a decade falls short. *Can. J. Bot.* 85, 443–456

- Beharry Z., Palzkill T. (2005) Functional analysis of active site residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 280:18(6) 17786-17791
- Bela K., Horváth E., Gallé A., Szabados L., Tari I., Csiszár J. (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. J. Plant Physiol. 176, 192-201
- Bennett W.P., Alavanja M.C., Blomeke B., Vahakangas K.H., Castren K., Welsh J.A., Bowman E.D., Khan M.A., Flieder D.B., Harris C.C. (1999) Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. J. Natl Cancer Inst., 91, 2009–2014.
- Berndt C., Lillig C.H., Holmgren A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. BBA- Mol. Cell Res. 1783:4, 641-650
- 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
- Bertholee D., Maring J.G., van Kuilenburg A.B.P. (2017) Genotypes affecting the pharmacokinetics of anticancer drugs. Clin. Pharmacokin. 56, 317-337
- Beuckmann C.T., Fujimori K., Urade Y., Hayaishi O. (2000) Identification of mu class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. Neurochem. Res. 25, 733–738.
- Bhardwaj T. (2015) Review on biosensor technologies. IJARET 6(2), 36-62
- Bico P., Erhardt J., Kaplan W., Dirr H. (1995) Porcine class pi glutathione S-transferase – anionic ligand-binding and conformational analysis. Biochim. Biophys. Acta 1247, 225–230
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523
- Blackburn A.C., Woollatt E., Sutherland G.R., Board P.G. (1998) Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. Cytogenet. Cell. Genet. 83(1–2), 109–114
- Board P.G. (2011) The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. Drug Metab. Rev. 43, 226–235
- Board P.G., Menon D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. Biochimica et Biophysica Acta. 1830, 3267–3288
- Boehr D.D., Dyson H.J., Wright P.E. (2006) An NMR perspective on enzyme dynamics. Chem Rev. 106(8), 3055–79
- Boehr D.D., Wright P.E. (2008) How do proteins interact? Science. 320(5882), 1429–30
- Booth J., Boyland E., Sims P. (1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochem. J. 79, 516-524
- Bornot A., Etchebest C., de Brevern A.G. (2011) Predicting protein flexibility through the prediction of local structures. Proteins 79(3), 839–52

- Borron S.W, Baud F.J. (2012) Antidotes for acute cyanide poisoning, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1940–1948
- Bowatte G., Lodge C.J., Perret J.L., Matheson M.C., Dharmage S.C. (2016) Interactions of GST polymorphisms in air pollution exposure and respiratory diseases and allergies. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16:85
- Bray H.G., Franklin T.J., James S.P. (1958) The possible role of glutathionase. Formation of mercapturic acid 71, 690-696
- Briggs G.E., Haldane J.B.S. (1925) A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* 19(2), 338-339
- Brock J., Board P.G., Oakley A.J. (2013) Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. *PLoS ONE* 8(4): e60324. doi:10.1371/journal.pone.0060324
- Brown A.J. (1902) Enzyme action. *J. Chem. Soc. Trans.* 81, 373—388, <http://dx.doi.org/10.1039/ct9028100373>
- Cárdenas M.L. (2014) Understanding mechanisms of enzyme co-operativity: The importance of not being at equilibrium. *Persp. Sci.* 4, 10-16
- Chan C., Lam H-M. (2014) A putative lambda class glutathione S-transferase enhances plant survival under salinity stress. *Plant Cell Physiol.* 55(3), 570-579
- Chang B.S.W., Ugalde J.A., Matz M.V. (2005) Applications of ancestral protein reconstruction in understanding protein function: GFP-like proteins. *Meth. Enzymol.* 395, 652-670
- Chatterjee A., Majumdar S. (2014) An amperometric approach towards construction of a cholesterol biosensor. *IJAR* 2(4), 753-758
- Chatzikonstantinou M., Vlachakis D., Chronopoulou E., Papageorgiou L., Papageorgiou A.C. Labrou N.E. (2017) The glutathione transferase family of *Chlamydomonas reinhardtii*: Identification and characterization of novel sigma-like class enzymes. *Algal Res.* 24, 237-250
- Chen P.X., Tang Y., Marcone M.F., Pauls P.K., Zhang B., Liu R., Tsao R. (2015) Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 185, 298-308
- Chen S., Chen X., Dou W., Wang L., Yin H., Guo S. (2016) GST(*phi*) gene from macrophyte *Lemna minor* is involved in cadmium exposure responses. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 34(2), 342-353
- Cho H.Y., Kong K.H. (2007) Study on the biochemical characterization of herbicide detoxification enzyme, glutathione S-transferase. *Bio-factors* 30, 281-287
- Choi H., Harrison R., Komulainen H., Saborit J.M.D. (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Geneva: World Health Organization, 289-345 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138709/>

Choi J-W., Kim Y-K., Oh B-K., Song S-Y., Lee W.H. (2003) Optical biosensor for simultaneous detection of captan and organophosphorus compounds. *Biosens. Bioelectr.* 18(5-6), 591-597

Chronopoulou E., Ataya F.S., Pouliou F., Perperopoulou F., Georgakis N., Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Ioannou E., Labrou N.E. (2017b) Structure, evolution and functional roles of plant glutathione transferases. © Springer International Publishing AG. M.A. Hossain et al. (eds.), *Glutathione in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*, https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_9

Chronopoulou E., Chatzikonstantinou M., Madesis P., Nianiou-Obeidat I., Labrou N.E. (2016) Structure and catalytic properties of human glutathione transferase P1-1. *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*, 187-198

Chronopoulou E., Georgakis N., Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Perperopoulou F., Pouliou F., Vasilopoulou E., Ioannou E., Ataya F.S., Labrou N.E. (2017) Plant glutathione transferases in abiotic stress response and herbicide resistance. © Springer International Publishing AG M.A. Hossain et al. (eds.), *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*, https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_10

Chronopoulou E., Kontouri K., Chantzikonstantinou M., Pouliou F., Perperopoulou F., Voulgari G., Bosmali E., Axarli I., Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Tsaftaris A., Labrou N.E. (2014b) Plant Glutathione Transferases: Structure, Antioxidant Catalytic Function and in *planta* Protective Role in Biotic and Abiotic Stress. *Curr. Chem. Biol.* 8, 58-75

Chronopoulou E., Madesis P., Asimakopoulou B., Platis D., Tsaftaris A., Labrou N.E. (2012b) Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 235, 1253-1269

Chronopoulou E., Madesis P., Tsaftaris A., Labrou N. E. (2014a) Cloning and characterization of a biotic-stress-inducible glutathione transferase from *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 595-609

Chronopoulou E.G., Labrou N.E. (2009) Glutathione Transferases: Emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Rec. Patents Biotech.* 3, 211-223

Chronopoulou E.G., Labrou N.E. (2011) Site-saturation Mutagenesis: A Powerful Tool of Structure-Based Design of Combinatorial Mutation Libraries

Chronopoulou E.G., Papageorgiou A.C., Markoglou A., Labrou N.E. (2012a) Inhibition of human glutathione transferases by pesticides: Development of a simple analytical assay for the quantification of pesticides in water. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 81, 43– 51

Circu M.L., Aw T.Y. (2008) Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 42: 689-706

Ciucu A.A., Negulescu C., Baldwin R.P. (2003) Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosens. Bioel.* 18, 303-310

- Cleland W.W. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 104 – 137
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.C.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144-151
- Combes B., Stakelum G.S. (1961) A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. Clin. Invest.* 40, 981-988
- Conroy P.J., Hearty S., Leonard P., O’Kennedy R.J. (2009) Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 10-26
- Cooper M.A., Singleton V.T. (2007) A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J. Mol. Recognit.* 20, 154-184
- Copley S.D., Novak W.R.P., Babbitt P.C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochem.* 43 (44), 13981–13995 doi: 10.1021/bi048947r
- Cornish-Bowden A. (2013) The origins of enzyme kinetics. *FEBS Letters* 587, 2725-2730
- Corticeiro S., Freitas R., Figueira E. (2013) The role of GSTs in the tolerance of *Rhizobium leguminosarum* to cadmium. *Biometals.* 26:879–886 doi 10.1007/s10534-013-9664-9
- Covolo L., Placidi D., Gelatti U., Carta A., Scotto Di Carlo A., Lodetti P., Picciche A., Orizio G., Campagna M., Arici C., Porru S. (2008) Bladder cancer, GSTs, NAT1, NAT2, SUT1A1, XRCC1, XRCC3, XPC genetic polymorphisms and coffee consumption: a case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* 23, 355-362
- Csiszár J., Horváth E., Bela K., Gallé Á. (2016) Glutathione-related enzyme system: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs). © Springer International Publishing Switzerland 2016 D.K. Gupta et al. (eds.), Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses, 137-158, DOI 10.1007/978-3-319-44081-1_7
- Cummins I., Dixon D.P., Freitag-Pohl S., Skipsey M., Edwards R. (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* 43, 266-280
- da Fonseca R.R., Johnson W.E., O’Brien S.J., Vasconcelos V., Antunes A. (2010) Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evol. Biol.* 10:281
- Dangles O., Dufour C. (2006) in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications* (Andersen, Ø. M., and Markham, K. R., eds) 443–470, CRC Press, Boca Raton
- Daniel R.M., Dunn R.V., Finney J.L., Smith J.C. (2003) The role of dynamics in enzyme activity. *Bioinformatics* 32, 69 –92
- Davidi D., Milo R. (2017) Lessons on enzyme kinetics from quantitative proteomics. *Curr. Op. Biotech.* 46, 81-89

- De Araújo R.F.F., Martins D.B.G., Borba M.A.C.S.M. (2016) Oxidative stress and disease. The transcription factor Nrf2. <http://dx.doi.org/10.5772/65366>
- DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, San Carlos CA, USA, (2002)
- Deponte M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 3217-3266
- Desikan R., Hancock J., Neill S. (2005) In: Smirnoff N, Ed. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. 169-96.
- Dessi M., Noce A., Dawood K.F., Galli F., Taccone-Gallucci M., Fabrini R., Bocedi A., Massoud R., Fucci G., Pastore A., Villahermose S.M., Zingaretti V., Federici G., Ricci G. (2012) Erythrocyte glutathione transferase: a potential new biomarker in chronic kidney diseases which correlates with plasma homocysteine. *Amino Acids* 43, 347-354
- Dias A.D., Kingsley D.M., Corr D.T. (2014) Recent Advances in Bioprinting and Applications for Biosensing. *Biosensors* 4, 111-136
- Diaz-Vivancos P., de Simone A., Kiddle G., Foyer C.H. (2015) Glutathione-linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Rad. Biol. and Med.* 89, 1154-1164
- Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. (1998) Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258-266
- Dixon D.P., Edwards R. (2009) Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 284, 21249–21256
- Dixon D.P., Edwards R. (2010) Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* 285, 36322–36329
- Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R. (2002) Protein family review: Plant glutathione transferases. *Genome Biol.*; 3: 3004.1-3004.10
- Dixon D.P., McEwen A.G., Laphorn A.J., Edwards R. (2003) Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 23930–23935
- Dixon D.P., Sellars J.D., Edwards R. (2011) The Arabidopsis phi class glutathione transferase *AtGSTF2*: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem. J.* 438, 63–70
- Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochem.* 71, 338–350
- Dong Y., Li C., Zhang Y., He Q., Daud M.K., Chen J., Zhu S. (2016) Glutathione S-transferase gene family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*: Comparative genomic study and their expression under salt stress. *Front. Plant Sci.* 7:139
- Dourado D.F.A.R., Fernandes P.A., Mannervik B., Ramos M.J. (2014) Isomerization of Δ^5 -Androstene-3,17-dione into Δ^4 -Androstene-3,17-dione catalyzed by human glutathione

transferase A3-3: A computational study identifies a dual role for glutathione. *J. Phys. Chem. A* 118, 5790-5800

du Rand E.E., Smit S., Beukes M., Apostolides Z., Pirk C.W.W., Nicolson S.W. (2015) Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5 :11779 doi: 10.1038/srep11779

Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y., Liang J. (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nuc. Acids Res.* 34, W116–W118

Edwards R., Dixon D.P., Walbot V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5, 193-198

Eklund B.I., Moberg M., Bergquist J., Mannervik B. (2006) Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.* 70, 747–754

Elsinghorst P.W., Worek F., Thiermann H., Wille T. (2013) Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Exp. Op. Drug Disc.* 8(12), 1467-1477

Erhardt J., Dirr H. (1995) Native dimer stabilizes the subunit tertiary structure of porcine class pi glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.* 230, 614-620

Ernst W., Jackman P., Doe K., Page F., Julien G., Mackay K., Sutherland T. (2001) Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 433–444

Fabiano C.C., Tezotto T., Favarin J.L., Polacco J.C., Mazzafera P. (2015) Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Front. Plant Sci.* 6:754. doi: 10.3389/fpls.2015.00754

Fabrini R., de Luca A., Stella L., Mei G., Orioni B., Ciccone S., Federici G., lo Bello M., Ricci G. (2009) Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination. *Biochem.* 48, 10473-10482

Federici L., Lo Sterzo C., Pezzola S., Di Matteo A., Scaloni F., Federici G., Caccuri A.M. (2009) Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res.* 69, 8025–8034

Field S.F., Matz M.V. (2010) Retracing evolution of red fluorescence in GFP-like proteins from *Faviina* corals. *Mol. Biol. Evol.* 27(2), 225-233

Fimognari C., Turrini E., Ferruzzi L., Lenzi M., Hrelia P. (2012) Natural isothiocyanates: genotoxic 364 potential versus chemoprevention. *Mutation research.* 750(2):107-31

Finkelstein Z.I., Baskunov B.P., Reijtens I.M., Boersma M.B., Vervoort J., Golovleva L.A. (2001) Transformation of the insecticide teflubenzuron by microorganisms. *J. Environ. Sci. Health* 36(5), 559–567

Fogel M.N., Schneider M.I., Rimoldi F., Ladux L.S., Desneux N., Ronco A.E. (2016) Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopsis*

connexa (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. Environ. Sci. Pollut. Res. 23(15), 14918-14926

Ford-Hutchinson A.W. (1990) Leukotriene B4 in inflammation. Crit. Rev. Immun. 10(1), 1-12

Forman H.J., Fukuto J.M., Torres M. (2004) Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287, C246-C256

Franssen M.C.R., Steunenbergh P., Scott E.L., Zuilhof H., Sanders J.P.M. (2013) Immobilised enzymes in biorenewables production. Chem. Soc. Rev. 42, 6491-6533

Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E. (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. Plant Cell 16:2176–2191

Frova C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. Biomol. Eng. 23, 149–169

Garipcan B., Caglayan M., Demirel G. (2011) New Generation Biosensors based on Ellipsometry. New Perspectives in Biosensors Technology and Applications. Prof. Pier Andrea Serra (Ed.), ISBN 978-953-307-448-1

Garrett R., Grisham C.M. (2010) Enzymes-Kinetics and Specificity. Biochemistry, Fourth Edition. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 406-407

Gaughitz G., Proll G. (2008) Strategies for label-free optical detection. Biosens. 21st Century 109, 395–435

Georgakis N.D., Karagiannopoulos D.A., Thireou T.N., Eliopoulos E.E., Labrou N.E., Tsoungas P.G., Koutsilieris M.N., Clonis Y.D. (2017) Concluding the trilogy: the interaction of 2,2'-dihydroxybenzophenones and their carbonyl N-analogues with human glutathione transferase M1-1 face to face with the P1-1 and A1-1 isoenzymes involved in MDR. Chem. Biol. Drug Des. 90:5, 900-908

Ginger G., Light Z., James R., Mahan V.P., Roxas Z., Randy D.A. (2005) Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings expressing a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance. Planta 222, 346-354

Goekkurt E., Hoehn S., Wolschke C., Wittmer C., Stueber C., Hossfeld D.K., Stoehlmacher J. (2006) Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)-novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. Br. J. Cancer 94, 281-286

Gokoglan T.C., Soylemez S., Kesik M., Toksabay S., Toppare L. (2015) Selenium containing conducting polymer based pyranose oxidase biosensor for glucose detection. Food Chem. 172, 219-224

Goode J.A., Rushworth J.V., Millner P.A. (2014) Biosensor regeneration; a review on common techniques and outcomes. Langmuir, DOI: 10.1021/la503533g

Gröger H., Capan E., Barthuber A., Vorlop K-D. (2001) Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. Org. Lett. 3(13), 1969-1972

Gründemann C., Huber R. (2017) Chemoprevention with isothiocyanates – from bench to bedside. *Cancer Letters* doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.033.

Guan Y., Nothnagel E.A. (2004) Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol.* 135, 1346–1366

Guengerich F.P. (2017) Intersection of the roles of cytochrome p450 enzymes with xenobiotic and endogenous substrates: relevance to toxicity and drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.* 30(1): 2–12. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00226>

Gui Y-X., Zhang L-S., Lv W., Zhang W-M., Zhao J-J., Hu X-Y. (2016) NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease. *Oncotarget.* 7(10), 10756-10764

Gunning V., Tzafestas K., Sparrow H., Johnston E.J., Brentnall A.S., Potts J.R., Rylott E.L., Bruce N.C. (2014) *Arabidopsis* glutathione transferases U24 and U25 exhibit a range of detoxification activities with the environmental pollutant and explosive, 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol.* 165, 854–865

Guo Q., Tomich A.D., McElheny C.L., Cooper V.S., Stoesser N., Wang M., Sluis-Cremer N., Doi Y. (2016) Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71: 2460–2465

Gupta M.N., Kapoor M., Majumder A., Singh V. (2011) Isozymes, moonlighting proteins and promiscuous enzymes. *Curr. Sci.* 100, 1152–1162

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139

Hall A.G., Autzen P., Cattan A.R., Malcolm A.J., Cole M., Kernahan J., Reid M.M. (1994) Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Res.* 54, 5251-5254

Han J-B., Li G-Q., Wan P-J., Zhu T-T., Meng Q-W. (2016) Identification of glutathione S-transferase genes in *Leptinotarsa decemlineata* and their expression patterns under stress of three insecticides. *Pest Biochem. Physiol.* 133, 26-34

Han Y-H., Hong S-J., Cheong H-K., Chung Y.J. (2013) Crystal structures of 26kDa *Clonorchis sinensis* glutathione S-transferase reveal zinc binding and putative metal binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 438, 457-461

Harms M.J., Thornton J.W. (2010) Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 360-366

Harris J. M., Meyer D. J., Coles B., Ketterer B. (1991) A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class Theta enzymes. *Biochem. J.* 278, 137–141

- Hasegawa K., Miwa S., Tajima T., Tsutsumiuchi K., Taniguchi H., Miwa J. (2007) A rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide, a harmful substance in food. *Toxicol. Lett.* 175, 82-88
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88
- Hayes J.D., Strange R.C. (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacology*, 61, 154-166
- Hegazy U.M., Mannervik B., Stenberg G.J. (2004) Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase pl-1. *J. Biol. Chem.* 279, 9586-9596
- Henri V. (1903) *Lois Générales de l'action des Diastases.* Hermann, Paris, <http://dx.doi.org/10.1007/bf01692307>.
- Hinchman C.A., Ballatori N. (1994) Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 41:4, 387-409, DOI: 10.1080/15287399409531852
- Ho R.J., Gibaldi M. (2004) *Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes Into Drugs*, John Wiley & Sons
- Hofmann L., Gulati S., Sears A., Stewart P.L., Palczewski K. (2016) An effective thiol-reactive probe for differential scanning fluorimetry with a standard real-time polymerase chain reaction device. *Anal. Biochem.* 499, 63-65
- Holgate S.T., Bradding P., Sampson A.P. (1996) Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: New directions in asthma therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98(1), 1-12
- Holinski A., Heyn K., Merkl R., Sterner R. (2017) Combining ancestral sequence reconstruction with protein design to identify an interface hotspot in a key metabolic enzyme complex. *Proteins* 85(2), 312-321
- Homaei A.A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R. (2013) Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* 6, 185-205
- Horiyama S. Hatai M., Takahashi Y., Date S., Masujima T., Honda C., Ichikawa A., Yoshikawa N., Nakamura K., Kunitomo M., Takayama M. (2016) Intracellular metabolism of α,β -unsaturated carbonyl compounds, acrolein, crotonaldehyde and methyl vinyl ketone, active toxicants in cigarette smoke: Participation of glutathione conjugation ability and aldehyde-ketone sensitive reductase activity. *Chem. Pharm. Bull.* 64, 585-593
- Horváth E., Brunner S., Bela K., Papdi C., Szabados L., Tari I., Csiszár J. (2015) Exogenous salicylic acid-triggered changes in the glutathione transferases and peroxidases are key factors in the successful salt stress acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 42, 1129-1140
- Hou Q., Ufer G., Bartels D. (2016) Lipid signaling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 30, 1029–1048

- Hovmöller S., Zhou T., Ohlson T. (2002) Conformations of amino acids in proteins. *Acta Cryst. D* 58, 768-776
- Howells R.E., Holland T., Dhar K.K., Redman C.W., Hand P., Hoban P.R., Jones P.W., Fryer A.A., Strange R.C. (2001) Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes in ovarian cancer: association with p53 expression and survival. *Int. J. Gynecol. Cancer* 11, 107-112
- Hsiao Y-L., Ho W-A., Yen J-H. (2013) Vertical distribution in soil column and dissipation in soil of benzoylurea insecticides diflubenzuron, flufenoxuron and novaluron and effect on the bacterial community. *Chemosphere* 90, 380–386
- Hu C-M.J., Fang R.H., Copp J., Luk B.T., Zhang L. (2013) A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins, *Nat. Nanotechnol.* 8, 336–340
- Huang Y-C., Misquitta S., Blond S.Y., Adams E., Colman R.F. (2008) Catalytically active monomer of glutathione S-transferase π and key residues involved in the electrostatic interaction between subunits. *J. Biol. Chem.* 283:47, 32880-32888
- Huber C., Bartha B., Harpaintner R., Schröder P. (2009) Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Env. Sci. Pollut. Res.* 16, 206–213
- Hui-Wen L., Ali-Osman F. (2007) Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr. Op. Pharmacol.* 7, 367-374
- Hurst R., Bao Y., Jemth P., Mannervik B., Williamson G. (1998) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferase. *Biochem. J.* 332: 97–100
- Iorio A., Polimanti R., Piacentini S., Liunbruno G.M., Manfellotto D., Fuciarelli M. (2014) Deletion polymorphism of GSTT1 gene as protective marker for allergic rhinitis. *CRJ*, 1-6
- Ishimoto T.M., Ali-Osman F. (2002) Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* 12, 543-553
- Ito R., Tomich A.D., McElheny C.L., Mettus R., Sluis-Cremer N., Doi Y. (2017) Inhibition of fosfomycin resistance protein FosA by phosphonoformate (foscarnet) in multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61: e01424-17
- Iyanagi T. (2007) Molecular mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. *International Review of Cytology.* 260, 35-112
- Jagadeeswaran G., Li Y-F., Sunkar R. (2014) Redox signaling mediates the expression of a sulfate-deprivation-inducible microRNA395 in Arabidopsis. *The Plant Journal* 77, 85–96 doi: 10.1111/tpj.12364
- Jain M., Ghanashyam C., Bhattacharjee A. (2010) Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics.* 11, 73-89

- Jakobson I., Warholm M., Mannervik B. (1979) The binding of substrates and a product of the enzymatic reaction to glutathione S-transferase A. *J. Biol. Chem.* 254, 7085–7089
- Jakoby W.B. (1978) The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* 46: 383-414
- Jana B., Czarzasta J., Jaroszewski J. (2014) Synthesis of leukotrienes in porcine uteri with endometritis induced by infection with *Escherichia coli*. *Reprod., Fert. and Dev.* 26, 1007–1016
- Jeschke V., Gershenzon J., Vassão D.G. (2016) A mode of action of glucosinolate-derived isothiocyanates: Detoxification depletes glutathione and cysteine levels with ramifications on protein metabolism in *Spodoptera littoralis*. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 71, 37-48
- Ji M., Barnwell C.V., Grunden A.M. (2015) Characterization of recombinant glutathione reductase from the psychrophilic Antarctic bacterium *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles*, doi 10.1007/s00792-015-0762-1
- Ji X., von Rosenvinge E.C., Johnson W.W., Tomarev S.I., Paitigorsky J., Armstrong R.N., Gilliland G.L. (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry.* 34, 5317-5328
- Jia B., Sun M., Sun X., Li R., Wang Z., Wu J., Wei Z., DuanMu H., Xiao J., Zhu Y. (2016) Overexpression of *GsGSTU13* and *SCMRP* in *Medicago sativa* confers increased salt-alkaline tolerance and methionine content. *Physiol. Plant* 156, 176- 189
- Johnson K.A. (2013) A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Letters* 587, 2753-2766
- Johnson M.K., Jacobsen D., Meredith T.J., Eyer P., Heath A.J., Ligtenstein D.A., Marrs T.C., Szinicz L., Vale J.A., Haines J.A. (2000) Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. *Emerg. Med.* 12, 22–37
- Jones A., Grossmann G., Danielson J.A.H., Sosso D., Chen L-Q., Ho C.H., Frommer W.B. (2013) *In vivo* biochemistry: Applications for small molecule biosensors in plant biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16(3), 389-395
- Joseph P.D., Mannervik B. (2006) *Molecular Toxicology* Oxford University Press, Second Edition
- Jowsey I.R., Thomson R.E., Orton T.C., Elcombe C.R., Hayes J.D. (2003) Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem J.* 373(Pt 2): 559–569
- Justino C.I.L., Freitas A.C., Pereira R., Duarte A.C., Santos T.A.P.R. (2015) Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *Trends in Anal. Chem.* 68, 2-17
- Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)*, 79(13), 1562–1583

- Kandimalla V.B., Tripathi V.S., Ju H. (2006) Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 73–106
- Kao C-W., Bakshi M., Sherameti I., Dong S., Reichelt M., Oelmüller R., Yeh K-W. (2016) A Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *Chinensis*) τ -type glutathione-S-transferase stimulates Arabidopsis development and primes against abiotic and biotic stress. *Plant Mol. Biol.* 92, 643-659
- Kapoli P., Axarli I.A., Platis D., Fragoulaki M., Paine M., Hemingway J., Vontas J., Labrou N.E. (2008) Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 498-503
- Karamitros C.S., Labrou N.E. (2016) Preserving enzymatic activity and enhancing biochemical stability of glutathione transferase by soluble additives under free and tethered conditions. *Biotech. Appl. Biochem.* 64(5), 754-764
- Karavangeli M., Labrou N.E., Clonis Y.D., Tsaftaris A. (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol. Eng.* 22, 121-128
- Kellaway C.H., Trethewie E.R. (1940) The liberation of a slow reacting smooth muscle stimulating substance in anaphylaxis. *QJ Exp. Physiol.* 30, 121-145
- Kelley M.K., Engqvist-Goldstein A., Montali J.A., Wheatley J.B., Schmidt D.E., Jr Kauvar L.M. (1994) Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. *Biochem. J.* 304, 843-848
- Kemp T.S. (2005) The origin and evolution of mammals. Oxford Uni. Press
- Kim S.K., Kang S.W., Chung J.H., Park H.J., Cho K.B., Park M-S. (2015) Genetic polymorphisms of glutathione-related enzymes (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) and schizophrenia risk: a meta-analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 19602–19611
- Kissoudis C., Kalloniati C., Flemetakis E., Madesis P., Labrou N.E., Tsaftaris A., Nianiou-Obeidat I. (2015) Maintenance of metabolic homeostasis and induction of cytoprotectants and secondary metabolites in alachlor treated *GmGSTU4* overexpressing tobacco plants, as resolved by metabolomics. *Plant Biotechnol. Rep.* 9, 287–296
- Klaus A, Zorman S, Berthier A, Polge C, Ramirez S, Michelland S, Seve M, Vertommen D, Rider M, Lentze N (2013) Glutathione S-transferases interact with AMP-activated protein kinase: evidence for S-glutathionylation and activation in vitro. *PLoS One* 8:e62497
- Kodera Y., Isobe K., Yamauchi M., Kondo K., Akiyama S., Ito K., Nakashima I., Takagi H. (1994) Expression of glutathione S-transferases alpha and pi in gastric cancer: a correlation with cisplatin resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, 203–208
- Koester R.P., Skoneczka J.A., Cary T.R., Diers B.W., Ainsworth E.A. (2014) Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. *J. Exp. Bot.* 65(12), 3311-3321

- Kolawole A.O. (2016) Catalysis of silver catfish major hepatic glutathione transferase proceeds via rapid equilibrium sequential random mechanism. *Toxicol. Rep.* 3, 598-607
- Kong K.H., Takasu K., Inoue H., Takahashi K. (1992) Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pK_a of the thiol group of glutathione in the enzyme-glutathione complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184, 194–197
- Koutsoumpli G.E., Dimaki V.D., Thireou T.N., Eliopoulos E.E., Labrou N.E., Varvounis G.I., Clonis Y.D. (2012) Synthesis and study of 2-(pyrrolesulfonylmethyl)-*N*-arylimines: a new class of inhibitors for human glutathione transferase A1-1. *J. Med. Chem.* 55, 6802-6813
- Krajewska B. (2016) A combined temperature-pH study of urease kinetics. Assigning pK_a values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 124, 70-76
- Kreuz S., Fischle W. (2016) Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenom.* 8:6, 843-862
- Kuang D., Yao Y., MacLean D., Wang M., Hampson D.R., Chang B.S.W. (2006) Ancestral reconstruction of the ligand-binding pocket of Family C G protein-coupled receptors. *PNAS* 103(38), 14050-14055
- Kuang Q., Purhonen P., Ålander J., Svensson R., Hoogland V., Winerda J., Spahiu L., Ottosson-Wadlund A., Jegerschöld C., Morgenstern R., Hebert H. (2017) Dead-end complex, lipid interactions and catalytic mechanism of microsomal glutathione transferase 1, an electron crystallography and mutagenesis investigation. *Sci. Rep.* 7: 7897 doi:10.1038/s41598-017-07912-3
- Kumar A., Dhull D.K., Gupta V., Channana P., Singh A., Bhardwaj M., Ruhel P., Mittal R. (2017) Role of glutathione-S-transferases in neurological problems. *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 299–309
- Kumar D. (2014) Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228, 127–134
- Kundu S., Melton J.S., Sorensen D.C., Phillips G.N.Jr. (2002) Dynamics of proteins in crystals: Comparison of experiment with simple models. *Biophys. J.* 83, 723–732
- Labrou N.E., Kotzia G.A., Clonis Y.D. (2004) Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 741–748
- Labrou N.E., Mello L.V., Clonis Y.D. (2001) Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 358, 101-110
- Labrou N.E., Muharram M.M., Abdelkader M.S. (2016) Delineation of the structural and functional role of Arg111 in GSTU4-4 from *Glycine max* by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 1315-1321

- Labrou N.E., Papageorgiou A.C., Pavli O., Fliemetakis E. (2015) Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr. Op. Biotechnol.* 32, 186–194
- Ladner J.E., Parsons J.F., Rife C.L., Gilliland G.L., Armstrong R.N. (2004) Parallel Evolutionary Pathways for Glutathione Transferases: Structure and Mechanism of the Mitochondrial Class Kappa Enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43, 352-361
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685
- Lallement P-A., Brouwer B., Keech O., Hecker A., Rouhier N. (2014a) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front Pharmacol* 5:1–22
- Lallement P-A., Meux E., Gualberto J.M., Prosper P., Didierjean C., Saul F., Haouz A., Rouhier N., Hecker A. (2014b) Structural and enzymatic insights into Lamda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem. J.* 462, 39-52
- Lamoureux G.L., Shiabukuro R.H., Swanson H.R., Frear D.S. (1970) Metabolism of 2-chloro-4-ethyl-amino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J. Agric. Food Chem.* 18, 81–86
- Lan T., Yang Z-L., Yang X., Liu Y-J., Wang X-R., Zeng Q-Y. (2009) Extensive functional diversification of the populus glutathione S-transferase supergene family. *The Plant Cell*. 21, 3749–3766
- Laurent T.C., Moore E.C., Reichard P. (1964) Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239: 10, 3436-3444
- Lea W.A., Simeonov A. (2012) Differential scanning fluorimetry signatures as indicators of enzyme inhibitor mode of action: case study of glutathione S-transferase. *PLOS One* 7(4), 1-10
- Lederer B., Böger P. (2003) Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferase of *Zea mays* L. *BBA-Gen. Sub.* 1621(2), 226-233
- Lewis A.D., Forrester L.M., Hajes J.D., Wareing C.L., Carmichael J., Harris A.L., Mooghen M., Wolf C.R. (1989) Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour cell lines. *Br. L. Cancer* 60, 327-331
- Li D., Gao Q., Li X., Pang S., Liu Z., Wang C., Tan W. (2016) Characterization of glutathione S-transferases in the detoxification of metolachlor in two maize cultivars of differing herbicide tolerance. *Pest. Biochem. Physiol.* 143, 265-271
- Lima J.J., Thomason D.B., Mohamed M.H., Eberle L.V., Self T.H., Johnson J.A. (1999) Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 65, 519–525
- Lindström H., Peer S.M., Ing N.H., Mannervik B. (2017) Characterization of equine GST A3-3 as a steroid isomerase. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 178, 117-126

- Liu Y., Li J., Lu Y. (2015) Enzyme therapeutics for systemic detoxification. *Adv. Drug Del. Rev.* 90, 24-39
- Liu Y.J., Han X.M., Ren L.L., Yang H.L., Zeng Q.Y. (2013) Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiol.* 161, 773-786
- LoCicero L., Madesis P., Tsaftaris A., LoPiero A.R. (2015) Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (C₃GSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. *Phytochem.* 116, 69-77
- Loi V.V, Rossius M., Antelmann H. (2015) Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6:187. doi: 10.3389/fmicb.2015.00187
- Losos J.B. (2011) Seeing the forest for the trees: The limitations of phylogenies in comparative biology. *Am. Natur.* 177:6, 709-727
- Lu Q.J., Bo Y.C., Zhao Y., Zhao E-J., Sapa W.B., Yao M-J., Duan D-D., Zhu Y-W., Lu W-Q., Yuan L. (2016) Glutathione S-transferase M1 polymorphism and esophageal cancer risk: an updated meta-analysis based on 37 studies. *World J. Gastroenterol.* 22:1911–1918
- Lu S.C. (2013) Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3143-3153
- Lu W.D., Atkins W.A. (2004) Novel antioxidant role for ligandin behavior of glutathione s-transferases: attenuation of the photodynamic effects of hypericin. *Biochem.* 43: 12761-12769
- Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M. (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridization detection. *Anal. Chim. Acta* 609, 139-159
- Lucklum R., Hauptmann P. (2006) Acoustic-wave microsensors-the challenge behind microgravimetry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 667–682
- Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D. (2008) Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotech. Adv.* 26, 492-500
- Lushchak V.I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. Hindawi Publishing Corporation. *J. of Amino Acids* Vol 2012, Article ID 736837, 1-26, doi:10.1155/2012/736837
- Macken A., Lillicrap A., Langford K. (2015) Benzoylurea pesticides used as veterinary medicines in aquaculture: risks and developmental effects on nontarget crustaceans. *Environ. Tox. Chem.* 34(7), 1533-1542
- Maggini V., Buda G., Galimberti S., Conidi E., Giuliani N., Morabito F., Genestreti G., Iacopino P., Rizzoli V., Barale R., Petrini M., Rossi A.M. (2008) Response to chemotherapy and tandem autologous transplantation of multiple myeloma patients and GSTP1 and TYMS polymorphisms. *Leuk. Res.* 32, 49-53
- Mahajan S., Atkins W.M. (2005) The chemistry and biology of inhibitors and prodrugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1221–1233

- Malik A., Fouad D., Labrou N.E., Al-Senaïdy A.M., Ismael M.A., Saeed H.M., Ataya F.S. (2016) Structural and thermodynamic properties of *kappa* class glutathione transferase from *Camelus dromedarius*. *Int. J. Biol. Macrom.* 88, 313-319
- Malinowski H., Pawinska M. (1992) Comparative evaluation of some chitin synthesis inhibitors as insecticides against Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Pesticide Science* 35: 349–353
- Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 101, 3780–3785
- Mannervik B. (2012) Five decades with glutathione and the GSTome. *J. Biol. Chem.* 287, 6072–6083
- Mannervik B., Danielson U.H. (1988) Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337
- Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C.J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R.A., Zhang D., Zheng C., Geer L.Y., Bryant S.H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nuc. Ac. Res.* 45(D1), 200-203
- Marsella A.M., Jaskola M., Mabury S.A. (2000) Aqueous solubilities, photolysis rates and partition coefficient of benzoylphenylurea insecticides. *Pest. Manag. Sci.* 56, 789–794
- Mashiyama S.T., Malabanan M.M., Akiva E., Bhosle R., Branch M.C., Hillerich B., Jagessar K., Kim J., Patskovsky Y., Seidel R.D., Stead M., Toro R., Vetting M.W., Almo S.C., Armstrong R.N., Babbitt P.C. (2014) Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLOS Biol.* 12:4, 1-19
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enz. Microb. Tech.* 40, 1451-1463
- Materon E.M., Huang P.-J.J., Wong A., Ferreira A.A.P., Sotomayor M.D.P.T., Liu J. (2014) Glutathione S-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs. *Biosens. Bioel.* 58, 232–236
- Mayatepek E. (2014) Leukotrienes. N. Blau et al. (eds.), *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*, DOI 10.1007/978-3-642-40337-8_38, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 617-622
- Mayatepek E., Hoffmann G.F. (1995) Leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatric Res.* 37(1):1–9
- McIlwain C., Townsend D., Tew K. (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncog.* 25, 1639–1648. doi: 10.1038/sj.onc.1209373

- McTigue M.A., Williams D.R., Tainer J.A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246: 21-27.
- Mehrotra P. (2016) Biosensors and their applications –A review. *J. Or. Biol. Cran. Res.* 6, 153-159
- Meiers I., Shanks J.H., Bostwick D.G. (2007) Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathol.* 39(3), 299-304
- Meister A. (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-477
- Meng D., Zhang P., Zhang L., Wang H., Ho C-T., Li S., Shahidi F., Zhao H. (2017) Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *J. Funct. Foods* 37, 467-479
- Meng F., Brown G.L., Keck J.G., Henner W.D., Schow S.R., Gomez R., Wick M.M. (2001) Proceedings of the 2001 AACR-NCIEORTC International Conference.
- Meng Q-W., Wang J-J., Shi J-F., Guo W-C., Li G-Q. (2018) Effect of teflubenzuron ingestion on larval performance and chitin content in *Leptinotarsa decemlineata*. *Am. J. Potato Res.* <https://doi.org/10.1007/s12230-018-9646-0>
- Meng X., Zhang Y., Bao H., Liu Z. (2015) Sequence analysis of insecticide action and detoxification-related genes in the insect pest natural enemy *Pardosa pseudoannulata*. *PLoS ONE* 10(4): e0125242. doi:10.1371/journal.pone.0125242
- Merkl R., Sterner R. (2016) Ancestral protein reconstruction: techniques and applications. *Biol. Chem.* 397(1), 1-21
- Meschenmoser K., Kim Y., Franken S., Nowak M., Feldmann G., Bendas G., Wolfgarten M., Messmer D., Schmidt-Wolf I.G. (2013) Targeting Cancer with a Bi-functional Peptide: *In Vitro* and *in Vivo* Results. *In Vivo* 27, 431-42
- Mieyal J.J., Chock P.B. (2012) Post-translational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 16, 471–475
- Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C. (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTech.* 37(5), 790-802
- Mishra R.K., Dominguez R.B., Bhand S., Munoz R., Marty J-L. (2012) A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk. *Biosens. and Bioelectr.* 32, 56-61
- Mizohata E., Kumei M., Matsumura H., Shimaoka T., Miyake C., Inoue T., Yokota A., Kai Y. (2001) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1726-1728
- Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotech. Biotechnol. Eq.* 29(2), 205-220

- Mohsenzadeh S., Esmaeili M., Moosavi F., Shahrtaash M., Saffari B., Mohabatkar H. (2011) Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *Afr. J. Biotech.* 10(42), 8160-8165
- Monks T.J., Lau S.S. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* 10:1296313
- Monosik R., Stred'ansky M., Sturdik E. (2012) Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta Chim. Slov.* 5(1), 109-120
- Moorthy B., Chu C., Carlin D.J. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *SOT Toxic. Sci.* 145(1), 5-15
- Morgenstern R., Zhang J., Johansson K. (2011) Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2): 300–306
- Morris D., Gonzalez B., Khurasany M., Kassissa C., Luong J., Kasko S., Pandya S., Chu M., Chi P-T., Bui S., Guerra C., Chan J., Venketaraman V. (2013) Characterization of dendritic cell and regulatory T cell functions against mycobacterium tuberculosis infection. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International* Volume 2013, ArticleID 402827, 1-14
- Morris M.J., Craig S.J., Sutherland T.M., Board P.G., Casarotto M.G. (2009) Transport of glutathione transferase-fold structured proteins into living cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 676–685
- Morrison D.A. (2013) Phylogenetic networks are fundamentally different from other kinds of biological networks. *Nova Sci. Pub. Inc.* 23-69
- Mostofa M.G., Hossain M.A., Fujita M. (2014) Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma* doi: 10.1007/s00709-014-0691-3
- Moyer A.M., Salavaggione O.E., Hebring S.J., Moon I., Hildebrandt M.A., Eckloff B.W., Schaid D.J., Wieben E.D., Weinshilboum R.M. (2007) Glutathione S-transferase T1 and M1: gene sequence variation and functional genomics. *Clin. Cancer Res.* 13, 7207–7216
- Musdal Y., Mannervik B. (2015) Substrates specificities of two tau class glutathione transferases inducible by 2,4,6-trinitrotoluene in poplar. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1877-1883
- Namiki S., Tomida T., Tanabe M., Iino M., Hirose K. (2003) Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 592–597
- Napoli C., Ignarro L.J. (2003) Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 97-123
- Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Kissoudis C., Voulgari G., Chronopoulou E., Tsaftaris A., Labrou N.E. (2017) Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* 36:791–805

- Niesen F.H., Berglund H., Vedadi M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Prot.* 2(9), 2212-2221
- Nissar S., Sameer A.S., Rasool R., Chowdri N.A., Rashid F. (2017) Glutathione S-transferases: Biochemistry, polymorphism and role in colorectal carcinogenesis. *J. Carcinog. Mutagen.* 8:2, 1-9
- Noor E., Flamholz A., Liebermeister W., Bar-Even A., Milo R. (2013) A note on the kinetics of enzyme action: A decomposition that highlights thermodynamic effects. *FEBS Letters* 587, 2772-2777
- Nordlund P., Reichard P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 75:1, 681-706
- Norrgård M.A., Hellman U., Mannervik B. (2011) Cys-X scanning for expansion of active-site residues and modulation of catalytic functions in a glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 286, 16871–16878
- Oakley A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151
- Oakley A.J. (2005) Glutathione transferases: New functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 716-723
- Oakley A.J., Lo Bello M., Nuccetelli M., Mazzetti A.P., Parker M.W. (1999) The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* 291, 913-926
- Oldenburg J., Kraggerud S.M., Brydøy M., Cvancarova M., Lothe R.A., Fossa S.D. (2007) Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione S-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J. Transl. Med.* 5, 1
- Oliveira T.I.S., Oliveira M., Viswanathan S., Barroso F.M., Barreiros L., Nunes O.C., Rodrigues J.A., Lima-Neto P., Mazzetto S.E., Morais S., Delerue-Matos C. (2013) Molinate quantification in environmental water by a glutathione-S-transferase based biosensor. *Talanta* 106, 249–254
- Pagan M., Suazo D., Toro N., Griebenow K. (2015) A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. *Biosens. Bioelec.* 64, 138-146
- Pal D., Chakrabati P. (2002) On residues in the disallowed region of the Ramachandran map. *Biopolymers* 63, 195–206
- Pan J.L., Bardwell J.C.A. (2006) The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Science*, 15:2217–2227

- Pandey T., Chhetri G., Chinta R., Kumar B., Singh D.B., Tripathi T., Singh A.K. (2015b) Functional classification and biochemical characterization of a novel rho class glutathione S-transferase in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Open Bio.* 5, 1-7
- Pandey T., Singh S.K., Chhetri G., Tripathi T., Singh A.K. (2015a) Characterization of a highly pH stable Chi class glutathione S-transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS ONE* 10(5): e0126811. doi:10.1371/journal.pone.0126811
- Parbhoo N., Stoychev S.H., Fanucchi S., Achilonu I., Adamson R.J., Fernandes M., Gildenhuis S., Dirr H.W. (2011) A conserved interdomain interaction is a determinant of folding cooperativity in the GST fold. *Biochem.* 50, 7067-7075
- Park D.J., Stoehlmacher J., Zhang W., Tsao-Wei D.D., Groshen S., Lenz H.J. (2001) A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 61, 8654–8658
- Park H. (2012) Reduction of antibiotics using microorganisms containing glutathione S-transferases under immobilized conditions. *Environ. Toxicol. Phar.* 34, 345-350
- Park S-H., Kukushkin Y., Gupta R., Chen T., Konagai A., Hipp M.S., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. (2013) PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. *Cell.* 154: 134–145
- Pastore A., Mozzi A.F., Tozzi G., Gaeta L.M., Federici G., Bertini E., Lo Russo A., Mannucci L., Piemonte F. (2003) Determination of glutathionyl-hemoglobin in human erythrocytes by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 312, 85–90
- Pastore A., Piemonte F. (2012) S-Glutathionylation signaling in cell biology: Progress and prospects. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46, 279-292
- Patel P.N., Mishra V., Mandloi A.S. (2010) Optical biosensors: fundamentals and trends. *JERS* 1(1), 15-34
- Pauling L., Zuckerkandl E. (1963) Chemical paleogenetics: Molecular restoration studies of extinct forms of life. *ACTA Chim. Scan.* 17, S9-S16
- Paumi C.M., Smitherman P.K., Townsend A.J., Morrow C.S. (2004) Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-Delta (12,14) prostaglandin J(2) (15-d-PGJ(2)). *Biochemistry*, 43, 2345–2352
- Pavlidis N., Tseliou V., Riga M., Nauen R., Van Leeuwen T., Labrou N.E., Vontas J. (2015) Functional characterization of glutathione S-transferases associated with insecticide resistance in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.pestbp.2015.01.009>
- Pedone E., Limauro D., D'Ambrosio K., De Simone G., Bartolucci S. (2010) Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:3797–3814 doi 10.1007/s00018-010-0449-9

Pégeot H., Koh C.S., Petre B., Mathiot S., Duplessis S., Hecker A., Didierjean C., Rouhier N. (2014) The poplar phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front. Plant Sci.* 5:712, 1-15

Κλώνης Ι. (2007). *Ενζυμολογία*. Εκδόσεις Έμβρο, Αθήνα