

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός ισοενζύμων της
οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης**

ΚΑΘΟΛΙΚΗ Ε. ΣΚΟΠΕΛΙΤΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2011

Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός ισοενζύμων της
οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης

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

“Η έγκριση της παρούσης διδακτορικής διατριβής υπό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώψεων του συγγραφέως”

[Νόμος 5343/1932, άρθρο 202]

Η ανάθεση του θέματος της διδακτορικής διατριβής («Μηχανική και μελέτη ενζύμων που τροποποιούν αλογονο-υποκατεστημένες ξενοβιοτικές ενώσεις») έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 10^η/13-07-2007) και η τροποποίηση του θέματος της διδακτορικής διατριβής ως εξής «Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός ισοενζύμων της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης» έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 7^η/15-12-2010). Ο ορισμός της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 25-10-2011).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων

Νικόλαος Λάμπρου - Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη

Ιωάννης Κλώνης - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνος Βοργιάς - Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νικόλαος Λάμπρου – Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ιωάννης Κλώνης - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνος Βοργιάς - Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Ηλίας Ηλιόπουλος - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σπυρίδων Κίντζιος - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Εμμανουήλ Φλεμετάκης - Επικ. καθηγητής Γ.Π.Α.

Ιωάννης Βόντας - Αναπληρωτής καθηγητής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί με την έγκριση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής ως εξής:

Sfetsas, C., Skopelitou, K., Milios, L., Veniaraki, N., Todou, R., Flemetakis, E., Katinakis, P., Clonis, Y., Labrou, N. E. (2009). Characterization of 1,2-dibromoethane-degrading haloalkane dehalogenase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **Enzyme and Microbial Technology**. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.07.013

Skopelitou, K., Labrou, N. E. (2010). A new colorimetric assay for glutathione transferase-catalyzed halogen ion release for high-throughput screening. **Anal Biochem**. 405, 201-206. doi:10.1016/j.ab.2010.06.007

Skopelitou, K., Muleta, A. W., Pavli, O., Skaracis, G. N., Flemetakis, E., Papageorgiou, A. C., Labrou, N. E. (2011). Overlapping protective roles for glutathione transferase gene family members for chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. **Functional & Integrative Genomics** DOI: 10.1007/s10142-011-0248-x.

Skopelitou, K., Platis, D., Axarli, I., Labrou, N. (2008). Glutathione Transferases in Drug Discovery and Development: Towards Safer and Efficacious Drugs. **In Frontiers in Drug Design and Discovery, Bentham Science Publishers Ltd.**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας νιώθω έντονα την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συμμετείχαν και βοήθησαν για την άρτια διεκπεραίωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ν. Λάμπρου καθώς η συνεχής καθοδήγηση του και η αμέριστη υποστήριξη του στάθηκαν αρωγοί στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας. Σας ευχαριστώ για την ανεξάντλητη επιμονή, υπομονή και την αισιοδοξία που μου κληροδοτήσατε για να αντιμετωπίσω τις αποτυχίες της δουλειάς. Σας χρωστάω πολλά.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Ι. Κλώνη για την άψογη συνεργασία και τις συμβουλές του οι οποίες υπήρξαν πολύτιμες για την βέλτιστη δομή της διδακτορικής διατριβής.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις υποδείξεις τους και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους κατά τη διόρθωση και παρουσίαση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τους καλούς μου φίλους και συνεργάτες, την Ειρήνη Αξαρλή, τον Δημήτρη Πλατή, τη Λία Κουρή, το Χρήστο Καραμήτρο με τους οποίους μοιράστηκα όλες τις δυσκολίες και τις ερευνητικές ανησυχίες καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής. Ποτέ δεν μου αρνήθηκαν τη βοήθεια όταν τη χρειάστηκα και πάντα εξαιτίας τους το εργασιακό περιβάλλον ήταν ευχάριστο. Την κ. Ε. Παππά, Ε.Τ.Ε.Π του εργαστηρίου, την ευχαριστώ για την υπομονή της και τη σημαντική συμβολή της στη λειτουργία του εργαστηρίου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές για την κατανόησή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που πιστεύουν σε εμένα και στους οποίους οφείλω ότι είμαι και ό,τι έχω επιτύχει μέχρι σήμερα. Ευχαριστώ τον πατέρα μου που υπήρξε ο πρώτος μου δάσκαλος, την μητέρα μου που μου έμαθε από τα πρώτα παιδικά μου χρόνια πως να τραβάω ίσιες γραμμές και την αδερφή μου, γιατί είναι οι άνθρωποι που με αγαπούν και με ανέχονται όπως είμαι αλλά και γιατί ήταν δίπλα μου να μου κρατούν το χέρι κάθε φορά που απογοητεύομουν.

Στους γονείς μου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

BES-GSH	1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CDNB	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
CuOOH	Υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου
DMSO	Διμεθυσουλφοξειδίο
DTNB	5,5- διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό) οξύ
EDTA	Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
GPx	Υπεροξειδάση του γλουταθείου
GRd	Αναγωγή του γλουταθείου
GSH	Γλουταθείο
GSTs	Μεταφοράσες του γλουταθείου
IC ₅₀	Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή
IPTG	Ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο
k _{cat}	Καταλυτική σταθερά
K _D	Σταθερά διάστασης
K _i	Σταθερά διάστασης αναστολέα ή σταθερά αναστολής
K _m	Σταθερά Michaelis
k ₃	Σταθερά μέγιστης ταχύτητας αδρανοποίησης
MeSH	β-μερκαπτοαιθανόλη
MTT	Βρωμίδιο του 3-(4,5-διμεθυλ-θειαζολ-2-υλ) -2,5-διφαινυλτετραζολίου
NADP ⁺	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένο)
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
S.A.	Ειδική δραστηριότητα
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
U (unit)	Ενζυμική μονάδα
V _{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xvii
---------------	------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Η γλουταθειόνη.....	3
1.1.1. Δράση της αναγωγάσης του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG Reductase, GR).....	4
1.1.2. Ρόλος της GSH.....	5
1.2. Τρανσφεράσες του γλουταθείου (GSTs).....	7
1.3. Ταξινόμηση των GSTs.....	7
1.3.1. Κυτταροπλασματικές GSTs (cGST).....	7
1.3.2. Μικροσωμικές GSTs (MAPEG).....	8
1.3.3. GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (FosA)....	10
1.4. Λειτουργικό προφίλ των GSTs.....	13
1.4.1. Εξέλιξη της καταλυτικής δράσης των GSTs.....	13
1.4.2. Τρόπος καταλυτικής δράσης.....	13
1.5. Καταλυτικές ιδιότητες των GSTs.....	14
1.5.1. Μεταβολισμός ξενοβιοτικών και ενδοβιοτικών ενώσεων.....	14
1.5.1.1. GST και αποτοξίνωση.....	14
1.5.1.2. GST και βιοενεργοποίηση	20
1.5.1.3. GST και βιοσυνθετικός μεταβολισμός.....	25
1.6. Δομή των ενζύμων GSTs.....	27
1.7. Φυτικές GSTs.....	31
1.7.1. Οι φ και τ τάξεις.....	32
1.7.2. Οι ζ και θ τάξεις	32
1.7.3. DHAR και λ τάξης GSTs.....	33
1.7.4. TCHQD GSTs.....	34
1.7.5. Γονιδιακή δομή των φυτικών GSTs.....	34
1.7.6. Πρωτεϊνική δομή και συσχέτιση δομής-καταλυτικής δράσης	34

1.8. Βακτηριακές GSTs.....	36
1.8.1. Καταλυτική δράση.....	37
1.8.2. Δομή των βακτηριακών GSTs.....	40
1.9. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των GSTs.....	44
1.9.1. Ιατρική.....	44
1.9.2. Περιβάλλον.....	46
1.9.2.1. Η μέθοδος της βιοεξυγίανσης για την αποικοδόμηση ανθεκτικών περιβαλλοντικών ρύπων.....	46
1.9.2.2. Ενζυμική βιοαποκατάσταση.....	47
1.9.3. Ανάπτυξη ανθεκτικών διαγονιδιακών φυτών.....	50
1.9.4. Ανάπτυξη βιοαισθητήρων.....	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
2.1. ΥΛΙΚΑ.....	59
2.1.1. Βιολογικά υλικά.....	59
2.1.2. Ένζυμα και πρωτεΐνες	59
2.1.3. Χημικά αντιδραστήρια, Kits και λοιπά υλικά.....	59
2.1.4. Αναλώσιμα.....	60
2.2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	61
2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	61
2.3.1. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	61
2.3.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA.....	62
2.3.3. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.....	63
2.3.4. Διάλυμα TB προετοιμασίας δεκτικών κυττάρων	63
2.3.5. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων.....	63
2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
2.4.1. Κατεργασία βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών για μετασχηματισμό (competent cells).....	63
2.4.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat-shock).....	64
2.4.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	65

2.4.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	65
2.4.5. Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα.....	66
2.4.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	66
2.4.7. Κατακρήμιση DNA.....	67
2.4.8. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA.....	67
2.4.9. Κλωνοποίηση προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5- CT/TOPO®.....	67
2.4.10. Μέθοδος Bradford (Bradford 1976).....	68
2.4.11. Διαπίδυση (Dialysis).....	69
2.4.12. Ανάλυση πρωτεϊνών.....	69
2.4.12.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE).....	69
2.4.12.2. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	70
2.4.13. Ετερόλογος έκφραση των ενζύμων GSTs σε βακτήρια <i>E. coli</i>	70
2.4.14. Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.....	71
2.4.15. Σύνθεση του προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα GSH- Sepharose-CL6B (BES-GSH).....	71
2.4.16. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή BES-GSH.....	72
2.4.17. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή Ni-NTA-αγαρόζης.....	72
2.4.18. Επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων.....	73
2.4.19. Φωτομετρικός προσδιορισμός της μεταφοράς του γλουταθείου (GST).....	74
2.4.19.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας παράγωγα νιτροβενζολίου CDNB, BDNB, FDNB, IDNB, PNBC και NBD-Cl ως υποστρώματα.....	74
2.4.19.2. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα υδροϋπεροξειδία CuOOH και t-BuOOH.....	75
2.4.19.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο HED (2,2-διθειοδιαιθανόλη).....	76
2.4.19.4. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DHA (διυδροασκορβικό οξύ).....	76

2.4.19.5. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια EA και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη.....	76
2.4.19.6. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα BSP (βρωμοσουλφοφθαλεΐνη) και HNE (trans-2-ενενάλη).....	77
2.4.19.7. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας ισοθειοκυανικές ενώσεις: ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας.....	78
2.4.19.8. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο p-NPA (οξική p-νιτροφαινόλη).....	79
2.4.19.9. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας fluorodifen.....	79
2.4.19.10. Φωτομετρικός προσδιορισμός αλογονοϊόντων.....	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ <i>AtuGST4</i>	83
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	85
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	89
3.2.1. Απομόνωση γενωματικού DNA.....	89
3.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	89
3.2.3. Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας.....	91
3.2.4. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του DNA (DNA sequencing).....	92
3.2.5. Ανάλυση με τη χρήση βιοϋπολογιστικής.....	92
3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	92
3.3.1. Αναζήτηση GST πρωτεϊνών στο βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens strain C58</i> σε ψηφιακές τράπεζες δεδομένων.....	92
3.3.2. Απομόνωση ολικού DNA από το βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens C58</i>	101
3.3.3. Αντίδραση PCR για την απομόνωση και ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ισοένζυμα GSTs από γενωματικό DNA.....	102
3.3.4. Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας των ισοενζύμων GSTs.....	107
3.3.5. Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας των επιλεγμένων κλώνων για ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων.....	109

3.3.6. Φυλογενετική ανάλυση του ενζύμου <i>AtuGST4</i>	111
3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	116

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΟΡΙΑΚΗ, ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ <i>AtuGST4</i>.....	125
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	127
4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	129
4.2.1. Καθαρισμός της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i> μέσω χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA-IMAC.....	129
4.2.2. Κινητική ανάλυση.....	130
4.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα.....	130
4.2.4. Εξάρτηση των κινητικών παραμέτρων από το ιξώδες.....	130
4.2.5. Θερμική σταθερότητα.....	130
4.2.6. Έλεγχος της καταλυτικής σταθερότητας του ενζύμου παρουσία παραγόντων σταθεροποίησης.....	131
4.2.7. Κρυσταλλογραφία του ενζύμου <i>AtuGST4</i>	131
4.2.8. Ανάλυση με τη χρήση βιοϋπολογιστικής	131
4.2.9. Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου <i>AtuGST4</i> στις θέσεις Ser25 και Phe22 με τη μέθοδο Quick Change PCR.....	132
4.2.10. Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου <i>AtuGST4</i> στη θέση Arg187 με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension).....	134
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	136
4.3.1. Καθαρισμός της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i> μέσω χρωματογραφίας συγγένειας.....	136
4.3.2. Επίδραση του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.....	139
4.3.3. Κινητική μελέτη του ενζύμου <i>AtuGST4</i>	141
4.3.4. Μελέτη της σταθερότητας της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i> υπό την επίδραση γλουταθείου και γλυκερόλης.....	149
4.3.5. Θερμική σταθερότητα του ένζυμου <i>AtuGST4</i>	152
4.3.6. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής δραστηριότητας....	154

4.3.7. Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της <i>AtuGST4</i> με το S-p- νιτροφαινυλο-GSH.....	161
4.3.7.1. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής.....	161
4.3.7.1.1. Διάγραμμα Ramachandran.....	161
4.3.7.1.2. Φυσικοχημικό προφίλ της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i>	163
4.3.7.2. Ανάλυση της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i>	167
4.3.7.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά της δομής της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i>	167
4.3.7.2.2. N-τελική δομική ενότητα.....	169
4.3.7.2.3. C-τελική δομική ενότητα.....	170
4.3.7.2.4. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ δομικών περιοχών και υπομονάδων.....	170
4.3.7.2.5. Η περιοχή δέσμησης του GSH (G-θέση).....	174
4.3.7.2.6. Η περιοχή δέσμησης ξενοβιοτικών ενώσεων (H-θέση).....	177
4.3.8. Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου <i>AtuGST4</i>	181
4.3.8.1. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του ενζύμου <i>AtuGST4</i> στις θέσεις Phe22 και Ser25.....	182
4.3.8.2. Μετάλλαξη του ενζύμου <i>AtuGST4</i> στη θέση Arg187Ala.....	186
4.3.8.3. Καθαρισμός μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala του ενζύμου <i>AtuGST4</i>	189
4.3.8.4. Κινητική μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala.....	191
4.3.8.5. Καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala.....	195
4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	199

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-*

10.....	209
5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	211
5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	218
5.2.1. Ετερόλογος έκφραση των ενζύμων GSTs.....	218

5.2.2. Καθαρισμός των ισοενζύμων GSTs μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή BES-GSH.....	218
5.2.3. Κινητική ανάλυση	219
5.2.4. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα.....	219
5.2.5. Εξάρτηση των κινητικών παραμέτρων από το ιξώδες.....	219
5.2.6. Θερμική σταθερότητα.....	219
5.2.7. Εξάρτηση της V_{max} από το pH.....	220
5.2.8. Προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις.....	220
5.2.9. Προσδιορισμός του IC_{50} της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις.....	220
5.2.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	220
5.2.11. Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας με τη μέθοδο προσδιορισμού αλογονοϊόντων.....	221
5.2.12. Κινητική μελέτη με τη μέθοδο προσδιορισμού αλογονοϊόντων.....	221
5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	222
5.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	222
5.3.2. Καθαρισμός των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10-10</i> μέσω χρωματογραφίας συγγενείας.....	226
5.3.3. Καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10-10</i>	228
5.3.4. Επίδραση του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.....	229
5.3.5. Κινητική μελέτη των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10-10</i>	231
5.3.6. Θερμική σταθερότητα των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10- 10</i>	238
5.3.7. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.....	239
5.3.8. Μελέτη της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10-10</i> από ξενοβιοτικές ενώσεις.....	242
5.3.9. Προσδιορισμός του IC_{50} της αναστολής των ενζύμων <i>GmGSTU2-2</i> και <i>GmGSTU10-10</i> από ξενοβιοτικές ενώσεις.....	245
5.3.10. Φωτομετρικός προσδιορισμός της καταλυτικής δράσης των GSTs έναντι αλογονωμένων ενώσεων.....	249

5.3.10.1. Μελέτη της καταλυτικής δράσης του <i>GmGSTU4-4</i> με μεταβολή των συνθηκών (υπόστρωμα, συγκέντρωση ενζύμου, χρόνος) του φωτομετρικού προσδιορισμού.....	249
5.3.10.2. Μελέτη της ενζυμικής δράσης του άγριου τύπου υπό την επίδραση αλογονωμένων υποστρωμάτων και πιθανών αναστολέων.....	251
5.3.10.3. Εφαρμογή του φωτομετρικού προσδιορισμού αλογονοϊόντων σε μικροπλακίδια με σκοπό τη σάρωση βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών GSTs.....	254
5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	255
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	263
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	273

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι ένζυμα που συνήθως δρουν ως διμερή και καταλύουν τη σύζευξη του τριπεπτιδίου γλουταθειόνη (GSH) με έναν αριθμό ηλεκτρονιόφιλων, λιπόφιλων ουσιών δημιουργώντας ένα υδατοδιαλυτό προϊόν, μειωμένης τοξικότητας. Αυτή η αντίδραση έχει αποδειχθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση πολλών τοξικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων καρκινογόνων και ζιζανιοκτόνων-εντομοκτόνων, σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, από θηλαστικά και έντομα έως φυτά. Ένας αριθμός GSTs παίζουν ρόλο στην εξουδετέρωση οξειδωτικών καταπονήσεων μέσω μίας επιπλέον δράσης των ενζύμων ως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, ενώ πλέον των καταλυτικών ιδιοτήτων τους, συγκεκριμένες GSTs ενεργούν και ως πρωτεΐνες-μεταφορείς για τη μεταφορά υδρόφοβων μορίων εντός του κυττάρου.

Ο στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορά κυρίως στη μελέτη του αποτοξινωτικού ρόλου ενζύμων GSTs ο οποίος βασίζεται στην κατάλυση αντιδράσεων σύζευξης με τοξικές ενώσεις και η ανάλυση της συμπεριφοράς φυτικών και βακτηριακών GSTs. Κατά την αρχική μελέτη βακτηριακών ισοενζύμων GSTs, πραγματοποιήθηκε μελέτη του γονιδιώματος του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* C58 και εύρεση αλληλουχιών στη βάση δεδομένων που αντιστοιχούν σε πιθανές GSTs. Σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές για συνολικά 8 ισοένζυμα (*AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8*) και ακολούθησε απομόνωση γενωματικού DNA από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58. Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενισχύθηκαν και απομονώθηκαν τα γονίδια και ακολούθως αλληλουχήθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της *E. coli*.

Τα ισοένζυμα που απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 εκφράστηκαν ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ενζύμων επέτρεψε τη φυλογενετική μελέτη τους και τον προσδιορισμό της εξελικτικής σχέσης τόσο μεταξύ τους όσο και με GSTs από άλλους οργανισμούς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενζυμικής τους δραστηριότητας έναντι μεγάλου εύρους αλογονωμένων αρωματικών υποστρωμάτων [1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), 1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB) και π-νιτροβενζυλ-χλωρίδιο (pNBC)]. Η οικογένεια ενζύμων *AtuGSTs* μελετήθηκε επίσης και ως προς τη δραστηριότητα υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από τη γλουταθειόνη (GPOX) χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου (CuOOH) και το tert-βουτυλο-

υδροϋπεροξειδίου (*tert*-BuOOH). Η αντίδραση αναγωγής του διυδροασκορβικού (DHA) σε ασκορβικό οξύ χρησιμοποιώντας GSH, αποκάλυψε ποια ένζυμα εμφανίζουν δραστηριότητα ρεδουκτάσης του διυδροασκορβικού οξέος (DHAR) ενώ η δραστηριότητα θειολτρανσφεράσης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) ως υπόστρωμα. Το ζιζανιοκτόνο fluoro-difen (διφαινυλαιθέρας), η βρωμοσουλφοφθαλεΐνη και το nitrobenzofurazan μελετήθηκαν επίσης ως πιθανά υποστρώματα των *Atu*GSTs. Τα υποστρώματα εθακρυνικό οξύ, *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη και *trans*-2-ενενάλη θεωρείται ότι σχηματίζουν συζευγμένα με τη GSH προϊόντα μέσω αντίδρασης προσθήκης Michael στο α,β -ακόρεστο καρβονυλικό τμήμα του μορίου και μελετήθηκαν και στην περίπτωση των ισοενζύμων από το *Ag. tumefaciens* C58. Τέλος, οι *Atu*GSTs ελέγχθηκαν επίσης για πιθανή δραστηριότητα εστεράσης χρησιμοποιώντας την οξική *p*-νιτροφαινόλη (*p*-NPA) ως πρότυπο υπόστρωμα, ενώ προκειμένου να εξεταστεί αν καταλύουν αποτελεσματικά την προσθήκη της σουλφυδρυλομάδας της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άτομο άνθρακα των ισοθειοκυανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ο φαινυλαιθυλ-εστέρας και ο ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας.

Από το σύνολο των 8 ισοενζύμων που μελετήθηκαν, επιλέχθηκε το ισοένζυμο *Atu*GST4, το οποίο παρουσίασε αξιοσημείωτα κινητικά χαρακτηριστικά προκειμένου να πραγματοποιηθεί περαιτέρω κινητική και δομική μελέτη του ενζύμου. Το ισοένζυμο *Atu*GST4 εκφράστηκε ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni-NTA-Sepharose με απόδοση και καθαρότητα που έφτανε >98%. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίδρασης διάφορων παραγόντων στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης όπως του pH και της θερμοκρασίας. Το άριστο pH δράσης που εμφανίζει το ένζυμο είναι κοντά στην περιοχή του 8 ενώ για δυο διαφορετικές τιμές pH 7.6, 7.9, οι τιμές T_m που προέκυψαν είναι $59,95 \pm 0,93$ °C και $63,33 \pm 1,12$ °C αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το άριστο pH δράσης που εμφανίζει το ένζυμο είναι κοντά στην περιοχή του 8, επιλέχθηκε ένα εύρος τιμών pH από 6 έως 8,3 προκειμένου να εξεταστεί η κινητική συμπεριφορά του ενζύμου έναντι του υποστρώματος CDNB. Οι τιμές pH 7.6 και 7.9 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) ενώ για την τιμή pH 7.6 παρατηρήθηκε και η χαμηλότερη K_m . Πραγματοποιήθηκε επίσης κινητική μελέτη του ενζύμου για τα υποστρώματα fluoro-difen, CuOOH, *tert*-BuOOH και HED. Οι τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερες για τα υπεροξειδία CuOOH και *tert*-BuOOH σε σχέση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη υποστρώματα. Επιπρόσθετα, ερευνήθηκε η δομική του σταθερότητα υπό την επίδραση γλουταθειόνης και γλυκερόλης.

Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *AtuGST4* προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ σε σύμπλοκο με τον αναστολέα νιτροβενζυλ-γλουταθείο (πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου, Τούρκου, Φιλανδία). Η δομή του ενζύμου επιλύθηκε και πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια περιγραφή και ανάλυση των χαρακτηριστικών της δομής, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δομικών περιοχών και των υπομονάδων καθώς και των περιοχών δέσμευσης της γλουταθειόνης και των ξενοβιοτικών ενώσεων. Η ανάλυση της δομής του ενζύμου υπέδειξε τρία αμινοξικά κατάλοιπα που αποτέλεσαν στόχο κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με σκοπό να προσδιοριστεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους με το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν στην καταλυτική διαδικασία. Ειδικότερα, με τη μέθοδο quick change PCR προκλήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στα αμινοξικά κατάλοιπα Phe22 και Ser25 τα οποία μετατραπήκαν σε Ala. Για τη μετάλλαξη του Arg187 σε Ala εφαρμόστηκε η μέθοδος επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των τριών αμινοξικών καταλοίπων (Phe22, Ser25 και Arg187) στην κατάλυση, οι μεταλλαγμένες μορφές καθαρίστηκαν, μελετήθηκε η ενζυμική τους δραστηριότητα έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων και μελετήθηκε η κινητική τους συμπεριφορά. Τέλος, ερευνήθηκε η επίδραση του ιζώδους στις κινητικές σταθερές των μεταλλαγμένων μορφών με σκοπό να βρεθεί το καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*.

Η κρυσταλλική δομή του *AtuGST4* προσδιορίστηκε με ανάλυση σε 1.4 Å. Παρόλο που το ένζυμο *AtuGST4* υιοθετεί την κανονική GST αναδίπλωση, αναγνωρίστηκαν ξεχωριστά χαρακτηριστικά στη δομή και την αλληλουχία της πρωτεΐνης που τη διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες ήδη χαρακτηρισμένες GSTs. Η απουσία των κλασικών, καταλυτικά απαραίτητων αμινοξικών καταλοίπων (Tyr, Ser, Cys) αποτελεί στοιχείο που διακρίνει την *AtuGST4* από όλες τις άλλες κυτταροπλασματικές GSTs ταυτοποιημένης δομής και λειτουργίας. Ένα αμινοξικό κατάλοιπο Arg (Arg34), ένα κατανεμημένο δίκτυο ηλεκτρονίων και μια γέφυρα ενός δικτύου μορίων νερού πιθανότατα αποτελούν τη βάση του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου. Η συγκριτική ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, οι δομικές πληροφορίες και η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σε συνδυασμό με τις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν ότι τα κατάλοιπα Phe22, Ser25, και Arg187 αποτελούν επιπρόσθετα σημαντικά δομικά στοιχεία τα οποία διαμορφώνουν την καταλυτική αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση του ενζύμου. Η ευρεία καταλυτική λειτουργική ικανότητα του ενζύμου σε συνδυασμό με την περιορισμένη κατανομή ομόλογων GSTs σε βακτήρια εδάφους, ίσως υπαγορεύουν έναν συγκεκριμένο λειτουργικό ρόλο για το ένζυμο *AtuGST4* ανάμεσα στα βακτήρια που διαβιούν στο έδαφος.

Όσον αναφορά τη μελέτη φυτικών ισοενζύμων GSTs, αυτή αρχικά περιλαμβάνει κλωνοποίηση δύο ενζύμων (*GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*) από σόγια (*Glycine max*) που ανήκουν στην οικογένεια τ (*tau*) των GSTs. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενισχύθηκαν και απομονώθηκαν τα γονίδια και ακολούθως αλληλουχήθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της *E. coli*. Τα ισοένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* από *Glycine max* εκφράστηκαν ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των συγκεκριμένων κλώνων (καθαρότητα >98%) με χρωματογραφία συγγένειας με προσροφητή που φέρει ακινητοποιημένη γλουταθειόνη σε αγαρόζη (BES-GSH). Τα καθαρά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η ενζυμική τους δραστηριότητα έναντι μιας σειράς πιθανών υποστρωμάτων. Οι χημικές ουσίες οι οποίες μελετήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα περιλαμβάνουν αλογονομένα παράγωγα, υπεροξειδία, ακόρεστες αρωματικές ενώσεις και ισοθειοκυανικά παράγωγα. Ακολούθησε κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τη γλουταθειόνη και τα υποστρώματα: 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), fluorodifen, υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου και tert-βουτυλ-υδροϋπεροξειδίο. Παρατηρήθηκε ότι για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του υποστρώματος CDNB, το ένζυμο *GmGSTU10-10* εμφανίζει σχεδόν τριπλάσια K_m σε σχέση με το *GmGSTU2-2*. Τα δύο ένζυμα εμφάνισαν παρόμοια κινητική συμπεριφορά όταν χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβαλλόμενα υποστρώματα τα fluorodifen και GSH. Από τη μελέτη του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης για το υπόστρωμα CDNB διαπιστώθηκε ότι για το ένζυμο *GmGSTU10-10* φαίνεται πως το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με την απελευθέρωση του προϊόντος της αντίδρασης, ενώ για το ένζυμο *GmGSTU2-2* το καθοριστικό στάδιο συνδέεται με τη χημεία της αντίδρασης ή με κάποια μη ελεγχόμενη από τη διάχυση δομική ανακατάταξη της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου ($T_m=60,95\pm 1,03$ °C και $T_m=62,43\pm 0,62$ °C για τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντίστοιχα) και προσδιορίστηκαν οι θερμοδυναμικές σταθερές της καταλυτικής αντίδρασης (E_a , ΔH^\ddagger , ΔS). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την επίδραση του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης από τα οποία προέκυψε ότι οι άριστες τιμές pH, και για τα δύο ένζυμα κυμαίνονται στη βέλτιστη περιοχή pH των ενζύμων GSTs. Στο πλαίσιο της κινητικής μελέτης των δύο ενζύμων, ελέγχθηκε η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από ξενοβιοτικές ενώσεις, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα (atrazin, permethrin, α -cypermethrin, β -cypermethrin, alachlor, carbaryl, diazinon, malathion, metalochlor, DDT, diuron, fenvalerate, λ -cyhalothrin, dieldrin, aldrin, endosulfan και propoxur) και προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} (ανασταλτική συγκέντρωση) με τους αναστολείς alachlor, fenvalerate, spirodichlofen και λ -cyhalothrin.

Όπως προαναφέρθηκε οι GSTs αποτελούν μια ομάδα ενζύμων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση και την εξυγίανση του εδάφους και των φυτών, επειδή έχουν την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις με αλογονωμένους ρύπους είτε πρόκειται για αλειφατικές είτε για αρωματικές ενώσεις. Ένας ακόμη σημαντικός στόχος της παρούσας διατριβής αφορά την ανάπτυξη μιας ταχείας και αξιόπιστης μεθόδου σάρωσης και ελέγχου μεγάλου αριθμού ισοενζύμων GSTs και μεταλλαγμένων μορφών προκειμένου να καθοριστεί ποιες από αυτές αποτελούν αποτελεσματικούς βιοκαταλύτες σε αντιδράσεις απαλογόνωσης. Η σπουδαιότητα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι πολυεπίπεδη καθώς σε πρώτο επίπεδο καταφέρνουμε να εκμεταλλευτούμε την ποικιλότητα βιβλιοθηκών ενζύμων και την ανάλυση πολλών διαφορετικών ενζύμων ταυτόχρονα. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αφορούν τη μελέτη μεγάλου αριθμού ξενοβιοτικών ενώσεων με τη χρήση ελάχιστων ποσοτήτων ενζύμου το οποίο δρα καταλυτικά υπό την επίδραση αλογονομένων ενώσεων. Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας βασίστηκε στον σχηματισμό χρωμογόνου (460 nm) που προκύπτει από την αντίδραση ιόντων υδραργύρου με ελεύθερα ιόντα αλογόνων που προκύπτουν από την απαλογόνωση των υποστρωμάτων. Επιπροσθέτως, η ένταση του χρώματος δείχνει τον βαθμό την καταλυτικής δράσης των ενζύμων, που μας επιτρέπει να επιλέξουμε όχι μόνο τους θετικούς κλώνους αλλά και εκείνους με την υψηλότερη καταλυτική ικανότητα. Η μέθοδος ανίχνευσης αλογονοϊόντων που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του ενζύμου *GmGSTU4-4* (από *Glycine max*) και τη σάρωση μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου που προέκυψαν από DNA shuffling ως προς διάφορα υποστρώματα (CDNB, IDNB,alachlor, atrazin, π-νιτροβενζυλοχλωρίδιο, 1,2-διβρωμοαιθάνιο, metolachlor) και πιθανούς αναστολείς (π-νιτροβενζυλ-GSH, endosulphan, permethrin, και fenvalerate).

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) are enzymes that normally act as dimeric proteins and catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione (GSH) with a number of electrophilic, lipophilic substances, creating a water-soluble product, with reduced toxicity. This reaction has been shown to play an important role in the degradation of many toxic molecules, including carcinogens, pesticides and herbicides in a wide range of organisms, from insects to mammals and plants. A number of GSTs play a role in the suppression of oxidative stress through an additional action of these enzymes as glutathione peroxidases, while beyond their catalytic properties, certain GSTs act as carrier proteins for the transport of hydrophobic molecules within the cell.

The overall objective of the present thesis is the study the detoxification role of GSTs enzymes isolated from plants and bacteria. Concerning the bacterial GSTs isoenzymes, the study was focused on the genome of *Agrobacterium tumefaciens* C58. A genome survey revealed the presence of eight GST-like proteins in *A. tumefaciens* C58 (*Atu*GSTs). Comparison by multiple sequence alignment generated a dendrogram revealing the phylogenetic relationships of *Atu*GSTs-like proteins. The beta and theta classes identified in other bacterial species are represented by five members in *A. tumefaciens* C58. In addition, there are three “orphan” sequences that do not fit into any previously recognized GST classes. The eight GST-like genes were cloned, expressed in *E. coli* and their substrate specificity was determined towards eighteen different substrates. The substrate specificity of the *Atu*GST family members was investigated in order to identify catalytic activities that may be related to their biological function. The assays included tests of thioether and thioester formation, i.e. nucleophilic attack at carbon as well as at electrophilic sulfur with an organic thiocyanate as substrate. In addition, the *Atu*GSTs were also examined whether they exhibit peroxidase, dehydroascorbate reductase or thioltransferase activity. The results showed that *Atu*GSTs catalyze a broad range of reactions, with different members of the family exhibiting quite varied substrate specificity.

A GST-like sequence from *A. tumefaciens* C58 (*Atu*GST4) with low similarity to other characterized GST family of enzymes was identified. Phylogenetic analysis showed that it belongs to a distinct from previously described GST classes. In order to characterize the *Atu*GST4 protein, the full-length sequence was cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed protein was tested for its ability to catalyze GSH/CDNB conjugation reaction. SDS-PAGE analysis of crude lysates showed that the recombinant enzyme was expressed at high levels as a soluble protein in *E. coli*. The enzyme did not bind adequately to the classical

affinity adsorbents (GSH-Sepharose or hexyl-GSH-Sepharose) that are widely used for the purification of recombinant as well as native GSTs. This indicates differences in G-site topology of *AtuGST4* compared to the majority of other GST classes that are efficiently purified using GSH-based affinity adsorbents. *AtuGST4* was purified (>98% purity) in a single-step procedure by metal-chelate affinity chromatography on Ni-NTA affinity adsorbent, suggesting that the enzyme may exhibit metal binding properties.

Functional analysis showed that *AtuGST4* exhibits significant transferase activities against the common substrates aryl halides, as well as very high peroxidation activity towards organic hydroperoxides. More specifically, regarding the several halogenated aromatic compounds that were tested, CDNB (and its analogues BDNB, FDNB, IDNB), and p-nitrobenzyl chloride were accepted substrates for the enzyme, although significant differences in specific activity were observed. The enzyme's specific activity for the 2,4-dinitrobenzyl halides decrease in the order of F>I > Br > Cl. Steady-state kinetic analysis using CDNB and GSH was carried out and the k_{cat} and K_m parameters were determined. The K_m values for GSH and CDNB were determined as 0,29 mM and 1,5 mM, respectively.

We have shown that *AtuGST4* exhibits high GSH-dependent peroxidase activity (GPOX) towards organic hydroperoxides such as cumene hydroperoxide and tert-butyl hydroperoxide. The specific activity with cumene hydroperoxide is 23,6 U/mg which is higher than that exhibited by other GST isoenzymes. With cumene hydroperoxide and tert-butyl peroxide as electrophile substrates, *AtuGST4* exhibits low K_m values with high catalytic efficiency (k_{cat}/K_m). These findings suggest that hydroperoxides may be the 'natural' substrates for *AtuGST4*. *AtuGST4* does not conjugate efficiently ethacrynic acid and the alkenals *trans*-4-phenyl-3-buten-2-one and nonenal. These substrates are thought to form conjugates with GSH *via* Michael addition reaction to the α,β -unsaturated ketone moiety. In addition, the enzyme does not conjugate efficiently the thiol group of GSH to the electrophilic central carbon of the isothiocyanate group using allyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate as substrates. *AtuGST4* showed dehydroascorbate reductase (DHAR) activity catalyzing the reduction of dehydroascorbate (DHA) to ascorbic acid in the presence of GSH. In addition, the enzyme exhibited thioltransferase activity using the 2-hydroxyethyl disulfide (HED) as a substrate. The k_{cat} and K_m values for HED were determined as 2.43 min⁻¹ and 4.12 mM, respectively. GSTs have a well-characterized role in determining the metabolism and selectivity of diphenylether herbicides such as fluorodifen. Fluorodifen is a photobleaching diphenylether herbicide that GSTs catalyze its conjugation with the GSH to form non-toxic S-glutathionylated products. *AtuGST4* exhibits relative moderate activity towards fluorodifen

and the K_m values for GSH and flurodifen were determined as 1.5 mM and 77.03 mM, respectively.

The crystal structure of *AtuGST4* has been determined at 1.4 Å resolution in complex with S-(p-nitrobenzyl)-glutathione (Nb-GSH). Although *AtuGST4* adopts the canonical GST fold we identified sequence and structural characteristics distinct from previously characterized GSTs. The absence of the classic catalytic essential residues (Tyr, Ser, Cys) distinguishes *AtuGST4* from all other cytosolic GSTs of known structure and function. An Arg residue (Arg34), an electron-sharing network and a bridge of a network of water molecules may form the basis of catalytic mechanism. Comparative sequence analysis, structural information and site-directed mutagenesis in combination with kinetic analysis showed that Phe22, Ser25, and Arg187 are important structural moieties that modulate the enzyme's catalytic efficiency and specificity. The wide catalytic function of this enzyme together with the restricted distribution of this class to soil bacteria may indicate a specific functional role for this enzyme in soil bacteria.

Regarding the study of plant GST isoenzymes, two GST genes from *Glycine max* were cloned and expressed in *E. coli*. The expressed proteins (*GmGSTU2-2* and *GmGSTU10-10*) were efficiently purified (>98% purity) using GSH-agarose affinity chromatography adsorbents. Enzyme activities were measured for 1-halogen-2,4-dinitrobenzole derivatives (CDNB, FDNB, BDNB, IDNB), fluorodifen, ethacrynic acid, 4-nitrobenzylchloride (NBC), bromosulfophthalein and trans-4-phenyl-3-buten-2-one. Other substrates used were cumene hydroperoxide (CuOOH), tert-butyl hydroperoxide, 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl), trans-2-nonenal, phenethyl isothiocyanate and allyl isothiocyanate. Dehydroascorbate reductase activity using dehydroascorbate (DHAR) as substrate and thioltransferase activity using the 2-hydroxyethyl disulfide (HED) as a substrate were also determined. A study for the inhibition of GST activity of *GmGST2-2* and *GmGST210-10* was also carried out using a large number of herbicides atrazine, diuron, alachlor, metolachlor and insecticides such as fenvalerate, permethrin, diazinon, malathion, carbaryl, α -cypermethrin, β -cypermethrin, λ -cyhalothrin, dieldrin, aldrin, DDT, endosulfan, propoxur. The results showed that both enzymes are sensitive to selected compounds such as permethrin, fenvalerate, λ -cyhalothrin, spirodiclofen, DDT and alachlor.

As mentioned above, glutathione transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) form a group of multifunctional enzymes catalyzing the conjugation of a broad range of toxicologically important halogenated compounds to the tripeptide glutathione (GSH) with concomitant

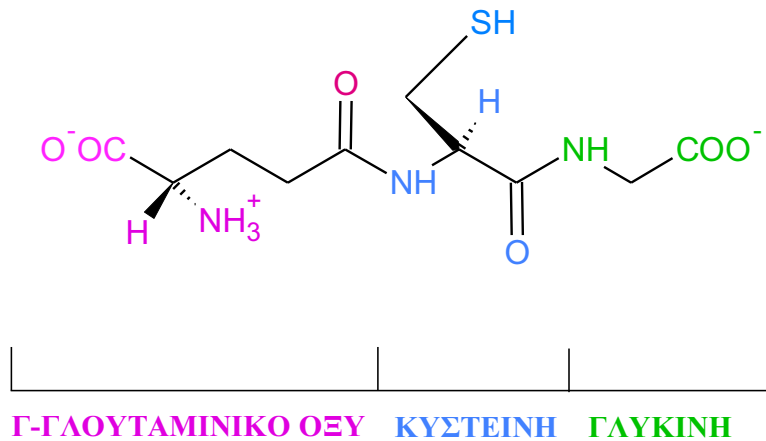
halogen ion release. Another important goal of the present thesis was to develop a rapid and reliable method of screening of GST isoenzymes and mutant libraries. A rapid quantitative screening method for GSTs based on colorimetric measurement of halogen ions released from halogenated xenobiotics was developed. The assay is based on the color formation resulting from the reaction of $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ with the released halogen ion of the substrate in the presence of Fe^{3+} . The color intensity is proportional to the extent of the catalytic reaction, allowing a quantitative measurement of the GST catalytic activity. The assay was performed using crude recombinant *Escherichia coli* cell lysates from the isoenzyme *GmGSTU4-4* from *Glycine max* in 96-well microtiter plates. The suitability of the colorimetric assay for screening mutant GST variants derived from a directed evolution library was successfully evaluated. In addition, the assay was also used for screening synthetic inhibitors. It was concluded that the proposed colorimetric assay is selective and sensitive and allows the screening of large numbers of samples within a few minutes. The ultimate goal is the application of this method in order to evaluate the biodegradative ability of GSTs to transform halogenated toxic environmental pollutants into non-toxic products.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

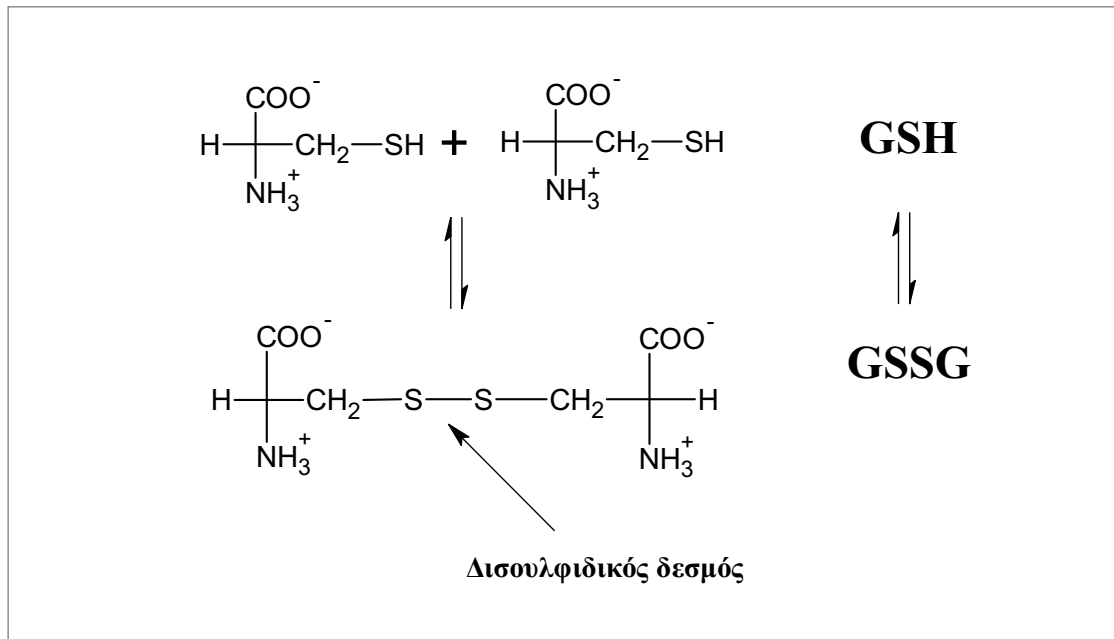
1.1. Η ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ

Η γλουταθειόνη (L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη ή GSH) αποτελεί την κύρια μικρομοριακή θειόλη και το πιο άφθονο χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδιο που έχει βρεθεί σε φυτικά, ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια καθώς επίσης σπανιότερα και σε αναερόβια βακτήρια, είναι παρούσα δε σε μικροσκοπικές συγκεντρώσεις της τάξης των mM (μέχρι 10mM) (Rouhier et al. 2008, Pompella et al. 2003). Η γλουταθειόνη είναι στην ουσία ένα τριπεπτίδιο, προϊόν συμπύκνωσης του γλουταμινικού οξέος, της κυστεΐνης και της γλυκίνης (Σχήμα 1.1). Από χημική άποψη, είναι ιδιαίτερα ασυνήθιστο το γεγονός ότι το γλουταμινικό κατάλοιπο συνδέεται με την κυστεΐνη μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ της πλευρικής γ-καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμινικού και της αμινικής ομάδας της κυστεΐνης (Σχήμα 1.1).



ΣΧΗΜΑ 1.1. Η δομή της γλουταθειόνης (GSH) (αηγημένη μορφή). Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο συνιστώμενο από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ (L-Glu), κυστεΐνη (L-Cys) και γλυκίνη (L-Gly).

Η γλουταθειόνη εναλλάσσεται μεταξύ μιας αηγημένης θειολομορφής (GSH) και μιας οξειδωμένης μορφής (GSSG). Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG, συχνά αναφερόμενο και ως οξειδωμένη γλουταθειόνη, προκύπτει ύστερα από οξείδωση και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης (Σχήμα 1.2). Εκτός όμως από την οξείδωση με τον εαυτό του, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως ελεύθερη κυστεΐνη, συνένζυμο A, καθώς και με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (Sies, 1999).



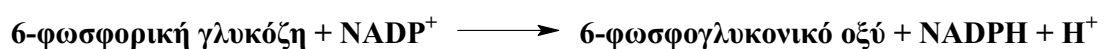
ΣΧΗΜΑ 1.2. Η αναγμένη (GSH) και οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG).

1.1.1. ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSSG REDUCTASE, GR).

Η αναλογία GSH/GSSG σε φυσιολογικά κύτταρα συνήθως είναι υψηλή και διατηρείται χάρη στη λειτουργία της αναγωγάσης του GSSG (EC 1.8.1.7) που αναλαμβάνει να ανάγει το GSSG σε GSH.



Το απαραίτητο NADPH προέρχεται από διάφορα ενζυμικά συστήματα των φυτικών και ζωικών κυττάρων με κύρια πηγή τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Το πρώτο ένζυμο του κύκλου αυτού, η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (glucose 6-phosphate dehydrogenase), καταλύει την αντίδραση σχηματισμού 6-φωσφογλυκονικού οξέος (6-phosphogluconate) με την ταυτόχρονη παραγωγή NADPH:



Στη συνέχεια ένα άλλο ένζυμο, η αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού οξέος, καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:



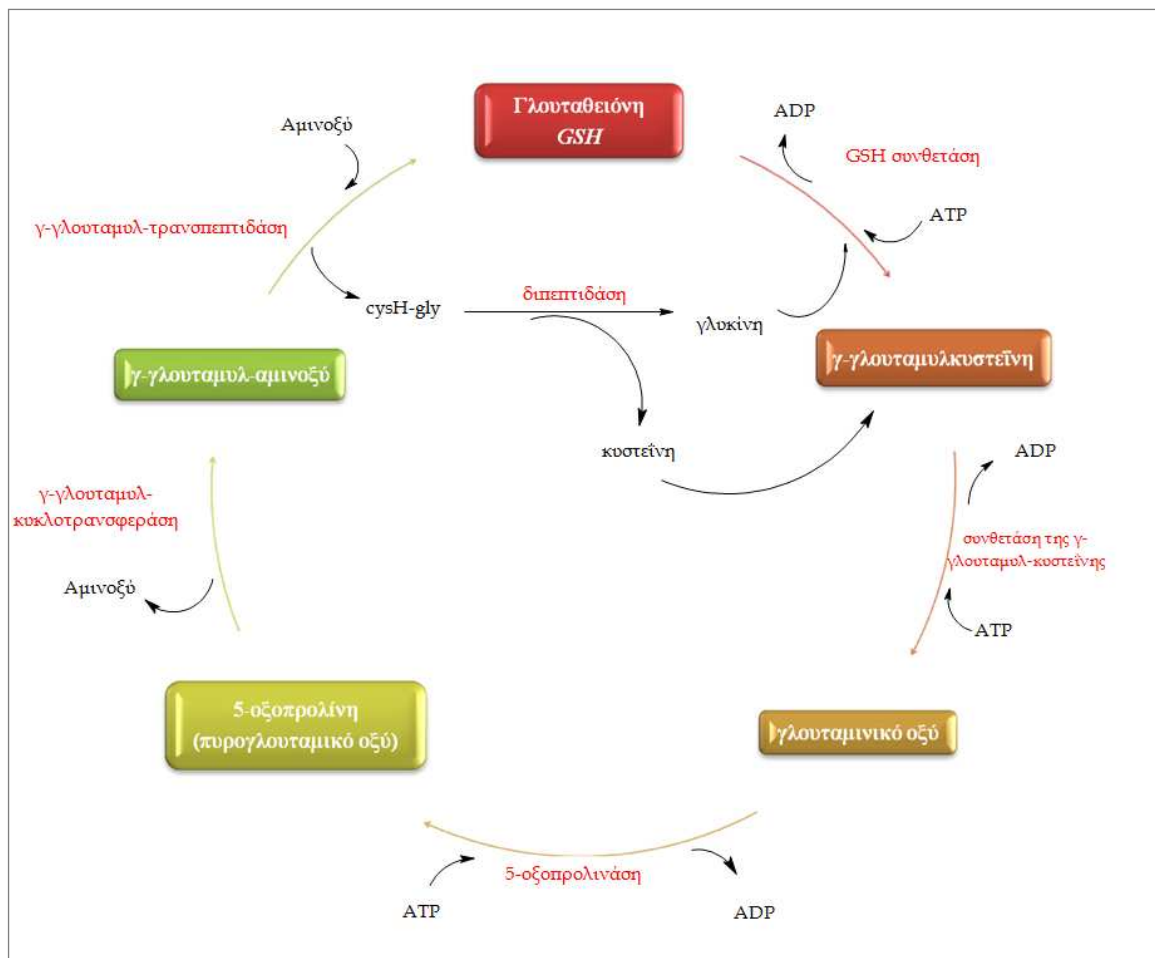
Ο ρυθμός λειτουργίας του παραπάνω κύκλου εξαρτάται από το πρώτο ένζυμο και την αναλογία NADPH/NADP⁺. Καθώς η δράση της αναγωγάσης του GSSG καταναλώνει NADPH, ο παραπάνω κύκλος επιταχύνεται για να αντικαταστήσει το NADPH που καταναλώθηκε.

Η αναγωγή του GSSG αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα μόριο FAD στο ενεργό της κέντρο. Το NADPH ανάγει το FAD το οποίο στη συνέχεια δίνει τα ηλεκτρόνιά του για να αναχθεί η δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ δύο κυστεϊνών του ενεργού κέντρου. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που δημιουργούνται αλληλεπιδρούν και ανάγουν το GSSG σε δύο μόρια GSH, ενώ ξανασηματίζεται η δισουλφιδική γέφυρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Halliwell & Gutteridge, 1999). Η ενεργότητα της αναγωγάσης του GSSG εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά έχει εντοπιστεί επίσης στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.1.2. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GSH

Η GSH είναι ευρέως διαδεδομένη σε κατώτερους και ανώτερους οργανισμούς και θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αντιστρεπτής οξειδωσης της ενεργής της θειολικής ομάδας (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Συμμετέχει επίσης σε αντιδράσεις συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Επιπρόσθετα, δρα, με την ιονισμένη μορφή της (GS⁻), ως νουκλεόφιλη ένωση αντιδρώντας με ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις, και με αυτόν τον τρόπο τις εμποδίζει να αντιδράσουν με βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA (Meister, 1988). *In vitro* η GSH αντιδρά άμεσα και εξουδετερώνει τη ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1999). Επίσης ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ή μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (May, Qu and Neel, 2003). Ο κύκλος γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων είναι γνωστός ως κύκλος Foyer-Halliwell-Asada (Halliwell & Gutteridge, 1999). Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε μεταβολικά μονοπάτια και αποτελεί το μέσο με το οποίο μεταφέρονται αμινοξέα μέσα στο κύτταρο (κύκλος της γ-γλουταμυλ-ομάδας) (Σχήμα 1.3), κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα βιοσύνθεση και διάσπαση της γλουταθειόνης (στο ήπαρ, στα νεφρά και σε άλλους ιστούς)

(Kerpler, 1999). Επιπλέον, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι συμμετέχει στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε ορισμένα μεμβρανικά συστήματα (Halliwell and Gutteridge, 1999). Γενικά, η γλουταθειόνη εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η GSH αναστέλλει την καταλάση (Sun & Oberley, 1989), ενώ εμπλέκεται και σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων, στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (Sies, 1999). Η γλουταθειόνη αποτελεί, τέλος, συμπαράγοντα ή υπόστρωμα για διάφορα ένζυμα. Τα ένζυμα τα εξαρτώμενα από τη γλουταθειόνη μαζί με αυτή, παρέχουν ένα δευτερεύον πλαίσιο άμυνας, συμμετέχοντας σε διεργασίες αποτοξίνωσης.



ΣΧΗΜΑ 1.3. Ο κύκλος της γ-γλουταμυλ-ομάδας του μεταβολισμού της γλουταθειόνης. Η συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης και η συνθετάση της GSH εκτελούν τα δυο πρώτα βήματα στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης. Τα ένζυμα γ-γλουταμυλτρανσπεπτιδάση, γ-γλουταμυλκυστοτρανσφεράση, 5-οξοπρωλινάση, και Cys-Gly διπεπτιδάση εμπλέκονται στον καταβολισμό της γλουταθειόνης.

1.2. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΥ (GSTs)

Οι τρανσφεράσες του γλουταθείου (GST, EC2.5.1.18) αποτελούν μία πολυπληθή οικογένεια ενζύμων που απαντώνται ευρέως στη φύση σε ποικίλους οργανισμούς: μικρόβια, έντομα, φυτά, ψάρια, πουλιά και θηλαστικά (Hayes and Pulford, 1995). Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε ζωικούς οργανισμούς το 1961 (Adler et al., 1999) όταν ανακαλύφθηκε η καταλυτική δράση των ενζύμων κατά την αντίδραση σύζευξης της γλουταθειόνης με το 1,2-διχλωρο-4-νιτροβενζόλιο (Booth et al., 1961) και με τη 4,5,6,7-τετραβρωμο-1,3-διωδρο-2-βενζοφουραν-1-όνη (bromosulphophthalein, BSP) (Coombes & Stakelum, 1960) σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη μελέτη του μεταβολισμού ξενοβιοτικών ουσιών. Στα φυτά, η παρουσία των ενζύμων διαπιστώθηκε το 1970, όταν η καταλυτική δράση μιας GST από καλαμπόκι φάνηκε να είναι υπεύθυνη για τη σύζευξη της χλωρο-S-τριαζίνης, της δραστικής ουσίας του ζιζανιοκτόνου ατραζίνης, με τη GSH με αποτέλεσμα την προστασία του φυτού από την τοξική δράση της ουσίας (Frear & Swanson, 1970). Σήμερα, οι δράσεις των GSTs μελετώνται για το σύνολο των ζωικών και φυτικών οργανισμών αλλά και για τα βακτήρια και τους μύκητες (Basantani & Srivastava, 2007) ενώ είναι πλέον γνωστός ο ρόλος-κλειδί που διαδραματίζουν στη φάση II της ενζυμικής αποτοξίνωσης.

1.3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GSTS

Οι S-τρανσφεράσες του γλουταθείου αντιπροσωπεύουν μία πολύπλοκη οικογένεια πρωτεϊνών στην οποία διακρίνονται τρεις (3) ξεχωριστές υπεριοικογένειες ενζύμων. Η πρώτη υπεριοικογένεια περιλαμβάνει τις κυτταροπλασματικές (cGST) ή διαλυτές GSTs οι οποίες ήταν οι πρώτες που χαρακτηρίστηκαν (Boyland & Chasseaud, 1969), η δεύτερη αποτελείται από τις πιο πρόσφατα προσδιορισμένες μικροσωμικές GSTs (MAPEG) (Jacobson et al., 1999), ενώ η τρίτη οικογένεια αντιπροσωπεύεται από τις GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (Arca et al., 1990, Bernat et al., 1997).

1.3.1. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ GSTs (cGST)

Επτά τάξεις κυτταροπλασματικών (ή διαλυτών) GSTs έχουν προσδιοριστεί στα θηλαστικά με κριτήριο την ομοιότητα των αμινοξικών αλληλουχιών τους: οι *α*, *μ*, *π*, *σ*, *θ*, *ω* και *ζ* (Hayes & Pulford, 1995, Armstrong, 1997, Sheehan et al. 2001, Hayes & McLellan, 1999). Από δομική άποψη, οι κυτταροπλασματικές GSTs από θηλαστικά, είναι διμερή ένζυμα αποτελούμενα από υπομονάδες μήκους 200–240 αμινοξέων. Οι υπόλοιπες τάξεις των κυτταροπλασματικών GSTs, *β*, *δ*, *ε*, *λ*, *φ*, και *τ*, έχουν ταυτοποιηθεί σε μη θηλαστικά είδη, βακτήρια, έντομα και

φυτά (Sheehan et al., 2001, Edwards & Dixon, 2005, Ding et al. 2003). Στις φυτικές GSTs, 7 από τις 8 διαφορετικές κλάσεις (φ , ζ , τ , θ , λ , DHAR και TCHQD) αποτελούνται από διαλυτές πρωτεΐνες ενώ μια είναι μικροσωμικής φύσεως (Edwards & Dixon, 2005, Basantani & Srivastava, 2007). Τα ισοένζυμα των κυτταροπλασματικών GSTs εντός της ίδιας τάξης παρουσιάζουν ομοιότητα >40% ενώ μεταξύ διαφορετικών τάξεων <25% (Mannervik et al. 1985).

Οι κυτταροπλασματικές GSTs στον άνθρωπο περιλαμβάνουν τουλάχιστον 16 γονίδια που υποδιαιρούνται σε 8 διαφορετικές τάξεις, α , κ , μ , π , σ , θ , ζ και ω (Hayes & McLellan, 1999). Αντίθετα με άλλα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας, οι GSTs της κ τάξης είναι μιτοχονδριακές (Pemble et al. 1996) και παρόλο που η πλειοψηφία των κυτταροπλασματικών GSTs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, εντούτοις, ορισμένες GSTs της α και κ τάξης είναι δυνατό να συνδέονται με τα μιτοχόνδρια και τις μεμβράνες του κυττάρου (Gardner & Gallagher, 2001, Raza et al. 2002, Robin et al. 2003).

Εκτός των αντιδράσεων σύζευξης, αναγωγής και ισομερείωσης που καταλύουν, οι κυτταροπλασματικές GSTs έχουν και μη καταλυτικό ρόλο αφού δεσμεύουν αντιστρεπτά (ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά) υδρόφοβες ενώσεις οι οποίες δεν αποτελούν υποστρώματά τους (Hayes & Pulford, 1995). Η δράση αυτή συμβάλλει στην ενδοκυτταρική μεταφορά, απομόνωση και αποβολή ξеноβιοτικών ουσιών και ορμονών. Τέτοιες ενώσεις αποτελούν οι αζωχρωστικές, η χολερυθρίνη, η αίμη, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), τα στεροειδή και οι θυρεοειδείς ορμόνες. Οι θέσεις δέσμευσης των συγκεκριμένων ουσιών (L-θέσεις δέσμευσης) αποτελούν χαρακτηριστικό των GSTs της α τάξης οι οποίες, για τον λόγο αυτόν, αρχικά ονομάστηκαν «δεσμευτικές» (Ligandin) (Hayes & Pulford, 1995).

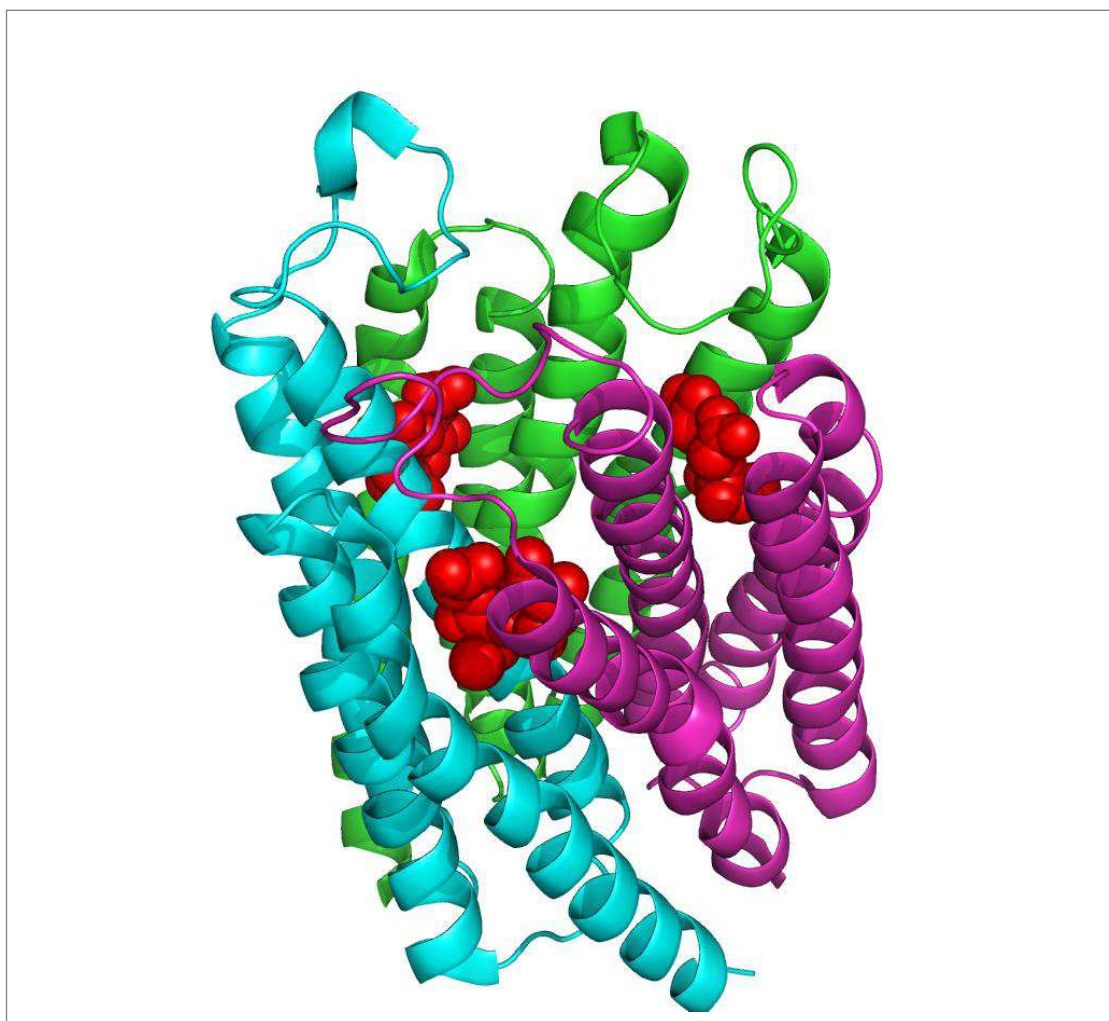
1.3.2. ΜΙΚΡΟΣΩΜΙΚΕΣ GSTs (MAPEG)

Οι μικροσωμικές GSTs είναι μέλη της οικογένειας των μεμβρανικών πρωτεϊνών γνωστής ως MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism), μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των εικοσανοειδών και της GSH (Jacobsson et al. 2000, Basantani & Srivastava, 2007). Οι MAPEG πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με βάση την ενζυμική δράση τους, την αμινοξική τους αλληλουχία και τα δομικά χαρακτηριστικά τους (Jakobsson et al. 2000) Το πρώτο ένζυμο της οικογένειας MAPEG ανακαλύφθηκε το 1980 (Morgenstern et al., 1980). Σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί έξι 6 μέλη που περιλαμβάνουν τις ανθρώπινες πρωτεΐνες: MGST1, MGST2, MGST3, τη συνθάση του C4 λευκοτριενίου (LTC4), την πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την 5-λιποξυγενάση (5-lipoxygenase-activating protein, FLAP) και τη συνθάση της προσταγλανδί-

νης (PGES1) (Jakobsson et al., 1999). Επίσης, σε μη θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά μέλη συμπεριλαμβανομένων ενζύμων από φυτά (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, και *Ricinus communis*), μύκητες (*Aspergillus nidulans*), και βακτήρια (*Synechocystis* sp. [SynMGST], *Escherichia coli* και *Vibrio cholerae*). Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τις παραπάνω 13 πρωτεΐνες (Jakobsson et al., 2000) υπέδειξε ξεκάθαρα ότι η οικογένεια MAPEG μπορεί να υποδιαιρεθεί σε 4 ομάδες (I-IV). Η πρώτη περιλαμβάνει τα μέλη FLAP, LTC4 και MGST2 που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων ενώ η δεύτερη την MGST3 μαζί με τις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τα φυτά και τους μύκητες. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στα βακτήρια (*E. coli* και *V. cholerae*) ενώ στην τέταρτη ανήκουν οι πρωτεΐνες MGST1 και PGES1.

Τα ένζυμα MGST1, MGST2 και MGST3, θεωρούνται αποτοξινωτικά (Morgenstern et al., 1983) αφού έχουν δράση GST (καταλύουν τη σύζευξη της γλουταθειόνης με το 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Επιπλέον, όμως λειτουργούν και ως υπεροξειδάσες του γλουταθείου. Από λειτουργική άποψη, η οικογένεια MAPEG συμμετέχει τόσο στον ενδογενή μεταβολισμό των λευκοτριενίων και προσταγλανδινών όσο και στην αποτοξίνωση ιδιαίτερα δραστηκών λιπόφιλων ενώσεων εξωγενούς και ενδογενούς προέλευσης (Jakobsson et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας MAPEG χαρακτηρίζονται από ένα εντελώς ξεχωριστό δομικό μοτίβο γεγονός που τις διαχωρίζει από τις διαλυτές GSTs (Jakobsson et al., 1999). Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής για το ένζυμο MGST1 (6Å) αποκάλυψε την ομοτριμερή τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης (Holm et al. 2002), ενώ μια παρόμοια δομή επίσης παρατηρήθηκε για το έτερο ένζυμο της IV ομάδας, την PGES1 (Thoren et al. 2003, Jegerschold et al. 2008) (Σχήμα 1.4). Σε αντίθεση με τις τριμερείς δομές αυτών των ενζύμων, η ομάδα I περιέχει πρωτεΐνες που σχηματίζουν μονομερή ή περισσότερο σύνθετες δομές. Για παράδειγμα, το ένζυμο FLAP μπορεί να υφίσταται σε μονομερείς, διμερείς και τριμερείς μορφές. Ομοίως το ένζυμο LTC4S μπορεί να σχηματίσει πολυμερή σύμπλοκα και ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη FLAP (Mandal et al. 2004). Περαιτέρω έρευνα, ωστόσο, απαιτείται για την κατανόηση της στοιχειομετρίας και τοπολογίας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

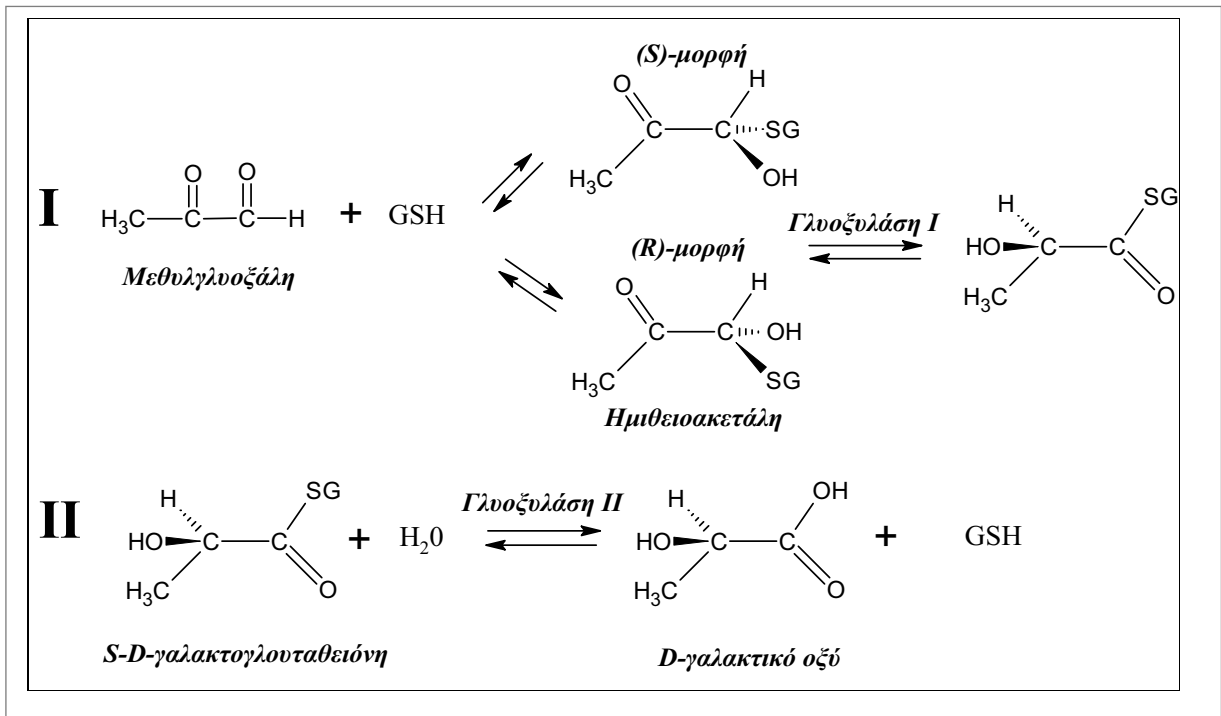


ΣΧΗΜΑ 1.4. Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης mPGES-1 (Jegerschold et al. 2008). Παρουσιάζονται οι υπομονάδες του τριμερούς και οι θέσεις δέσμευσης της γλουταθειόνης (κόκκινες σφαίρες). Η συγκεκριμένη αναπαράσταση, η οποία παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002), αποτελεί ένα ικανοποιητικό προσεγγιστικό δομικό μοντέλο και για την πρωτεΐνη MGST1 (Holm et al., 2006), βασισμένο στο ποσοστό ομοιότητας των αμινοξικών αλληλουχιών (38%) μεταξύ των δυο GSTs της IV ομάδας της οικογένειας MAPEG.

1.3.3. GSTs ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ ΦΩΣΦΟΜΥΚΙΝΗ (FOSA)

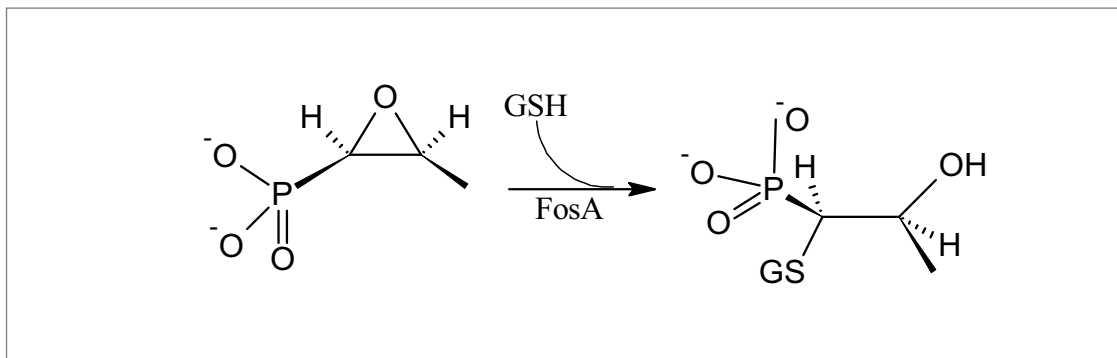
Η τέταρτη οικογένεια των GSTs περιλαμβάνει τις βακτηριακές μεταλλοθειοπρωτεΐνες (FosA) που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη [(1*R*,2*S*)-1,2 εποξυπροπυλφωσφονικό οξύ] (Arca et al. 1988, Arca et al. 1990b). Η οικογένεια FosA συνιστώνται από τρανσφεράσες του γλουταθείου εξαρτώμενες από τα Mn(II) και K(+). Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με τις γλυοξυλάσες οι οποίες παρεμβαίνουν στην παραγωγή του γαλακτικού οξέ-

ος και του γλουταθείου καταλύοντας μια σειρά από διαδοχικές αντιδράσεις (Σχήμα 1.5) (Bernat et al., 1997, Mannervik 2008, Vander Jagt 1993, Thornalley 2003a,2003b).



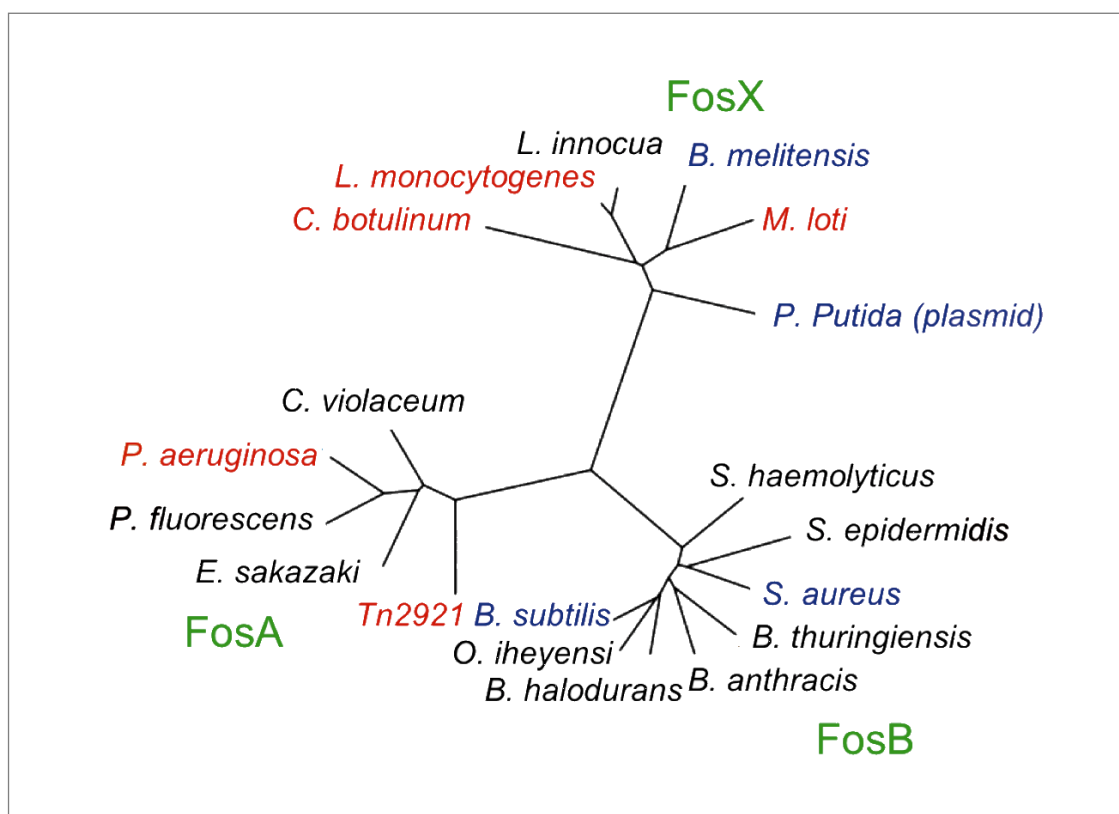
ΣΧΗΜΑ 1.5. Το γλυοξυλικό σύστημα. Οι γλυοξυλάσες I και II καταλύουν την μετατροπή της 2-οξοαλδεϋδης μεθυλ-γλυοξάλης σε D-γαλακτικό οξύ.S

Τα ένζυμα FosA αποτελούν, θα μπορούσε να πει κανείς, μια οικογένεια από ασυνήθιστες τρανσφεράσες του γλουταθείου, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς την αντίδραση προσθήκης της GSH στον οξιρανικό δακτύλιο της φωσφομυκίνης (Rife et al. 2002) (Σχήμα 1.6).



ΣΧΗΜΑ 1.6. Αντίδραση προσθήκης της GSH στον οξιρανικό δακτύλιο της φωσφομυκίνης.

Τρεις ακόμη οικογένειες ενζύμων προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη, τα ένζυμα FosB οι οποίες είναι θειολτρανσφεράσες της L-κυστεΐνης εξαρτώμενες από το $Mg(2^+)$ και οι πρωτεΐνες FosX, υδρολάσες του εποξειδίου της φωσφομυκίνης εξαρτώμενες από το Mn(II). Οι πρωτεΐνες FosC χρησιμοποιούν το ATP προσθέτοντας μια φωσφορική ομάδα στο μόριο της φωσφομυκίνης και καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο την ένωση αδρανή (García et al., 1995).



ΣΧΗΜΑ 1.7. Φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει τη σχέση μεταξύ των τριών οικογενειών πρωτεϊνών FosA, FosB και FosX που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη. Οι τρεις οικογένειες FosA, FosB και FosX παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα. Οι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν εκφραστεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά παρουσιάζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα. Προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής έχει πραγματοποιηθεί μόνο για τα ένζυμα που παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα (Armstrong et al., 2010).

Όμοια με τις υπόλοιπες οικογένειες των GSTs, η οικογένεια FosA, περιλαμβάνει ένα εύρος πρωτεϊνών που συναντώνται σε βακτήρια, φυτά και ζώα (Σχήμα 1.7). Η πρωτοταγής δομή των συγκεκριμένων πρωτεϊνών δεν σχετίζεται με καμία διαλυτή ή μικροσωμική GST, ενώ παράλληλα η κρυσταλλική δομή των ενζύμων αυτών ανέδειξε ένα μοναδικό επαναλαμβανόμενο μοτίβο εντελώς ξεχωριστό από τις υπόλοιπες οικογένειες των GSTs (Rife et al., 2002,

Rakhomona et al., 2004). Από λειτουργικής άποψης, επίσης ξεχωρίζουν, καθώς δεν συμμετέχουν σε αντιδράσεις κατάλυσης προσθήκης της γλουταθειόνης σε κανένα από τα συνηθισμένα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (π.χ το CDNB) τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στον ενζυμικό προσδιορισμό των διαλυτών τρανσφερασών του γλουταθείου (Arca et al. 1990b).

1.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ GST

1.4.1. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ GSTS

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, φαινόμενα όπως γονιδιακοί ανασυνδυασμοί αλλά και μεταλλάξεις, που έχουν αναδιαμορφώσει (reshape) τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος και επομένως προκάλεσαν αλλαγές στην εξειδίκευση του υποστρώματος, έδωσαν γένεση στα ένζυμα GSTs που υπάρχουν σήμερα. Τα ένζυμα αυτά είναι ικανά να καταλύουν αντιδράσεις με έναν τεράστιο αριθμό δομικά διαφορετικών υποστρωμάτων. Αυτό αποδεικνύει τη λειτουργική πλαστικότητα του δομικού «καλουπιού» των GSTs. Το γεγονός ότι πολλά μόρια που δρουν ως υποστρώματα για τις GSTs είναι ξενοβιοτικά, δείχνει ότι οι GSTs έχουν εξελιχθεί στο να ενεργούν πάνω σε λειτουργικές ομάδες και όχι πάνω σε συγκεκριμένες ενώσεις, γεγονός αναμενόμενο για αποτοξινωτικά ένζυμα. Ωστόσο, μερικές GSTs εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα έναντι ενός συγκεκριμένου υποστρώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση και να επιτελούν συγκεκριμένες καταλυτικές λειτουργίες.

Οι GSTs μπορούν να καταλύουν νουκλεόφιλες αλειφατικές και αρωματικές αντιδράσεις υποκατάστασης όπως και νουκλεόφιλες αντιδράσεις προσθήκης. Επίσης μπορούν να λειτουργήσουν ως υπεροξειδάσες και ισομεράσες. Τα περισσότερα υποστρώματα των GSTs έχουν ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο άνθρακα και τα περισσότερα από αυτά γ χαρακτηρίζονται και από υδρόφοβο χαρακτήρα. Ωστόσο, εκτός από τα άτομα άνθρακα, άτομα αζώτου, οξυγόνου και θείου μπορούν επίσης να αποτελέσουν στόχο για νουκλεόφιλη προσβολή από τη γλουταθειόνη.

1.4.2. ΤΡΟΠΟΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η δράση των GSTs δεν περιορίζεται μόνο στο να παρέχουν θέσεις δέσμευσης για τα υποστρώματα με σκοπό να τα τοποθετούν με τον πιο ευνοϊκό προσανατολισμό για τον σχηματισμό προϊόντος. Ανάμεσα στις ιδιότητες των ενζύμων συμπεριλαμβάνεται και η ενεργοποίηση της γλουταθειόνης. Η βάση για την καταλυτική λειτουργία των GSTs είναι η ικανότητά τους να χαμηλώνουν την τιμή pK_a της σουλφυδρυλομάδας της γλουταθειόνης η οποία ελαττώνεται

από την τιμή 9,2 σε διάλυμα (Jung et al., 1972) στην τιμή 6,1-7,5 (εξαρτάται από το ισοένζυμο) κατά τη δέσμευσή της στο ενεργό κέντρο μίας GST (Graminski et al., 1989a, Liu et al., 1992, Wang et al., 1992, Dietze et al., 1996, Caccuri et al., 1998, Gustafsson et al., 1999). Για τον λόγο αυτό, η κυρίαρχη μορφή της γλουταθειόνης στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης σε φυσιολογικό pH είναι το ανιόν GS^- , που είναι ισχυρά νουκλεόφιλο. Η αιτία μείωσης της τιμής του pK_a φαίνεται να είναι η σταθεροποίηση του ανιόντος GS^- λόγω ενός υδρογονικού δεσμού που σχηματίζει με την υδροξυλομάδα του αμινοξικού καταλοίπου που βρίσκεται κοντά στο θείο της γλουταθειόνης στο ενεργό κέντρο (Armstrong, 1997). Στις α , μ , π και σ τάξεις των ενζύμων GSTs, αυτό το υδροξύλιο προσφέρεται από ένα κατάλοιπο τυροσίνης της N-τελικής περιοχής, ενώ τα ένζυμα της θ , δ , φ και τ τάξης χρησιμοποιούν το υδροξύλιο μιας σερίνης. Η απουσία της υδροξυλομάδας δείχνει να προκαλεί μία αύξηση του pK_a της σουλφυδρυλομάδας της γλουταθειόνης και να επηρεάζει αρνητικά σε μεγάλο βαθμό την καταλυτική δράση του ενζύμου (Stenberg et al., 1991, Kolm et al. 1992, Liu et al. 1992, Board et al. 1995, Jemth & Mannervik, 2000). Όταν το GS^- σχηματίζεται στο ενεργό κέντρο της GST, καθίσταται ικανό να αντιδρά αυθόρμητα με ηλεκτρονιόφιλα ξενοβιοτικά που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση. Για το λόγο αυτό, ο καταλυτικός ρόλος των GSTs θεωρείται ότι οφείλεται στη συνδυαστική ικανότητα του ενζύμου να προωθεί τον σχηματισμό του GS^- και να δεσμεύει τις υδρόφοβες ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις στην κοντινότερη περιοχή. Η σύζευξη μεταξύ της GSH και των ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, σχεδόν πάντα οδηγεί σε ένα συζευγμένο προϊόν που είναι λιγότερο τοξικό από την αρχική ένωση, για αυτό η δράση των GSTs θεωρείται γενικά αποτοξινωτική.

1.5. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ GST

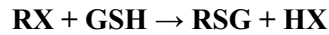
1.5.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1.5.1.1. GST ΚΑΙ ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗ

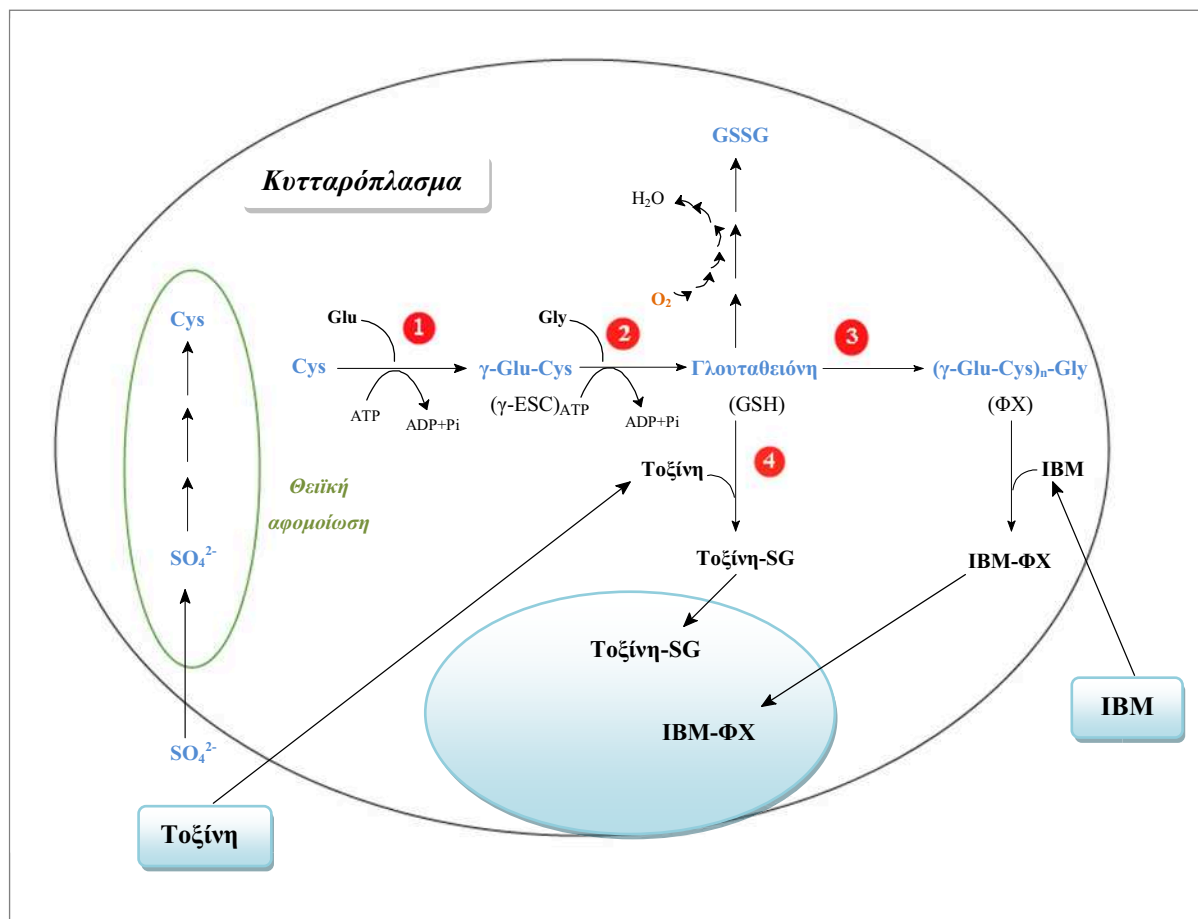
Ένας πολύ σημαντικός ρόλος των τρανσφερασών του γλουταθείου προκύπτει από τη συμμετοχή της στο μεταβολισμό ξένων προς τον οργανισμό μορίων, γνωστά ως ξενοβιοτικά μόρια (xenobiotics). Τα ξενοβιοτικά υποστρώματα για τις GSTs περιλαμβάνουν φάρμακα, καρκινογόνα χημικά, χημειοθεραπευτικές ουσίες (αιθακρινικό οξύ, cis-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος, χλωραμβουκίλη), περιβαλλοντικούς ρύπους, εντομοκτόνα (οργανοχλωρικά, πυρεθροειδή, καρβαμιδικά), ζιζανιοκτόνα, παρασιτοκτόνα και προϊόντα χημικής βιομηχανίας (Johansson & Mannervik, 2001).

Η σημαντικότερη καταλυτική δράση των GSTs είναι η κατάλυση της πυρηνόφιλης σύζευξης της ανηγμένης μορφής του τριπεπτιδίου της GSH με διάφορες υδρόφοβες, ηλεκτρονιόφιλες

και συνήθως κυτοτοξικές ενώσεις, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων είναι ξενοβιοτικές. Πολλά από τα ξενοβιοτικά μόρια αντιδρούν και συνδέονται με την γλουταθειόνη με τη βοήθεια της δράσης των GSTs σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα ένζυμα GSTs έχουν την ικανότητα αποτοξίνωσης συνθετικών χημικών όπως είναι τα αγροχημικά (φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα) τα οποία αποτελούν μία πολύ επικίνδυνη κατηγορία περιβαλλοντικών ρύπων. Οι GSTs μεταβολίζουν τέτοιες ενώσεις όπως τα DDT, ατραζίνη, λινδάνιο και μεθυλικό παραθειό καταλύοντας την αντίδραση σχηματισμού των προϊόντων σύζευξης με τη γλουταθειόνη ή δρώντας ως απαλογονάσες.

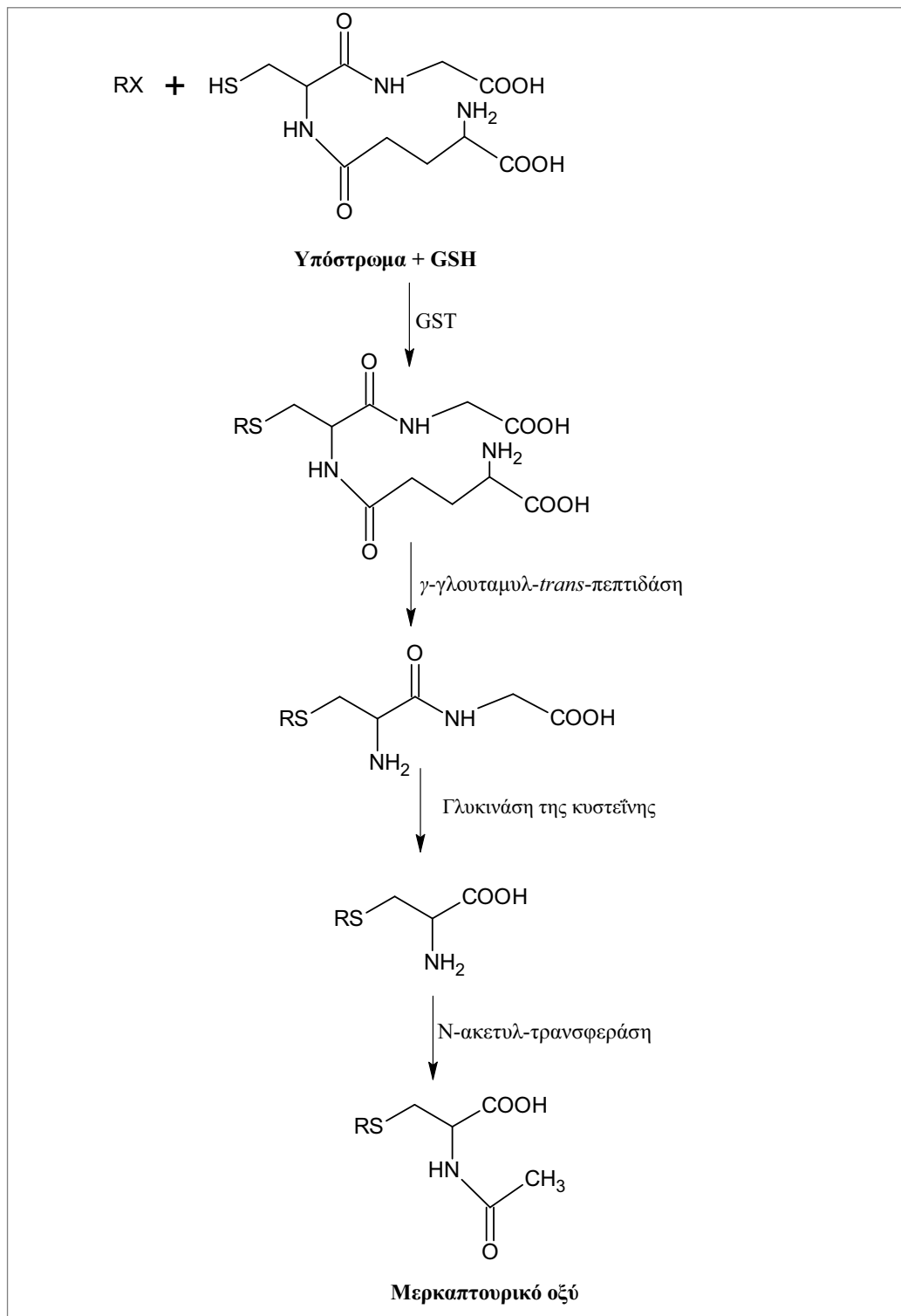


ΣΧΗΜΑ 1.8. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αποτοξίνωσης των φυτικών κυττάρων από βαρέα μέταλλα, οργανικούς ρύπους και οξειδωτικό στρες μέσω της γλουταθειόνης. Cys: κυστεΐνη, γ-Glu-Cys: γ-L-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνη, γ-ECS: συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, GSH: γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη, ΦΧ: φυτοχελατίνη, IBM: ιόν βαρέος μετάλλου, IBM-ΦΧ: σύμπλοκο βαρέος μετάλλου

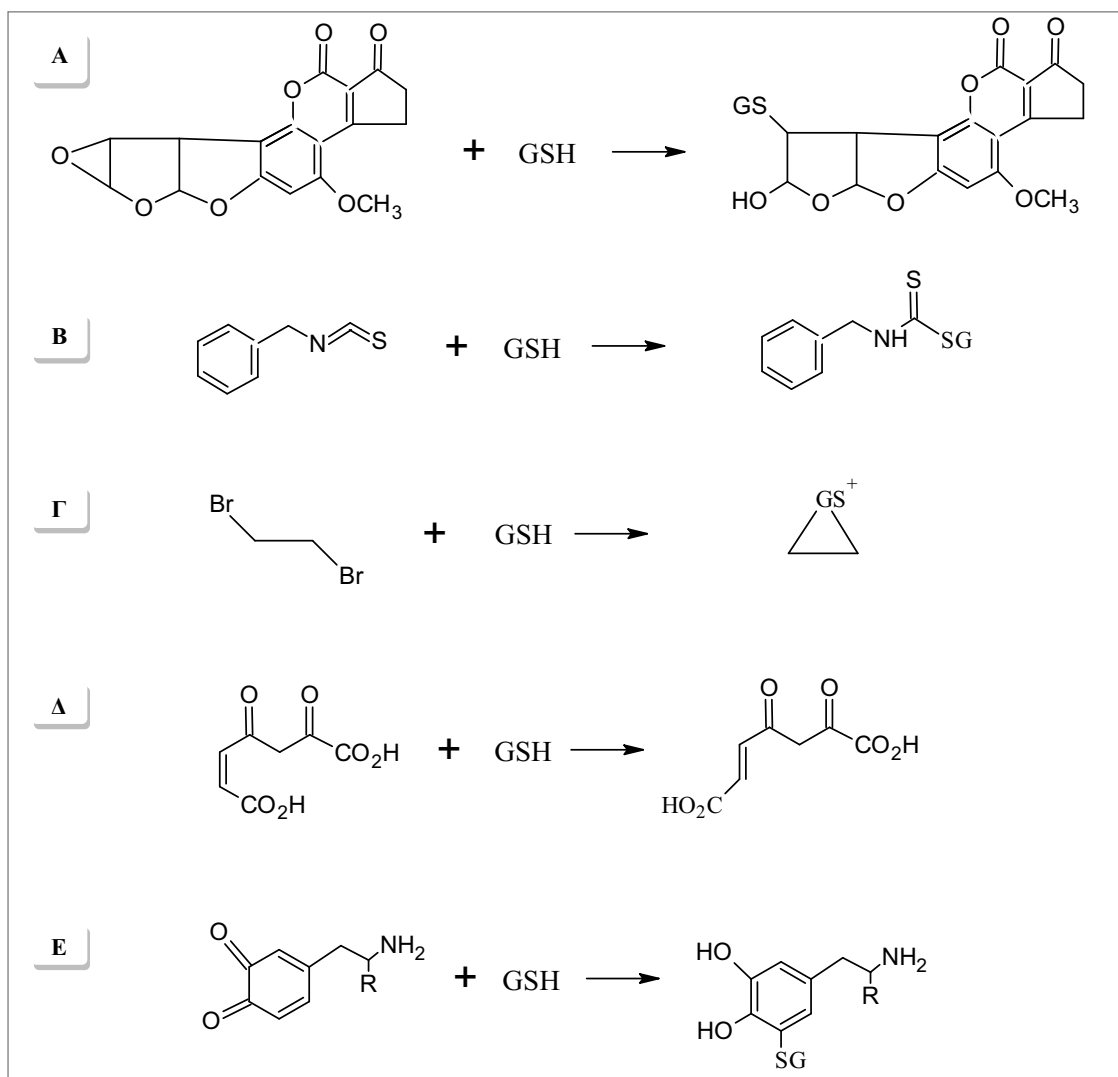
–φυτοχελαιτίνης, Τοξίνη: ξενοβιοτικές ουσίες, Τοξίνη–SG: σύζευξη τοξίνης–GSH. (1): συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (2): συνθετάση της γλουταθειόνης (3): συνθετάση της φυτοχελαιτίνης (4): S-τρανσφεράση του γλουταθείου (GST).

Τα ένζυμα GST διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φάση II του μεταβολισμού τέτοιων ξενοβιοτικών ενώσεων καθώς συνεισφέρουν στην επιβίωση του κυττάρου μέσω της αποτοξινωτικής διαδικασίας (Σχήμα 1.8). Στον ρόλο αυτό, η δράση των GST ακολουθεί την φάση I του μεταβολισμού η οποία καταλύεται συνήθως από μέλη της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (CYP) (Klaassen, 1996). Τα ένζυμα CYP καταλύουν την αντίδραση εισαγωγής μιας λειτουργικής ομάδας, όπως ενός εποξειδίου, σε ένα χημικά αδρανές ξενοβιοτικό. Αυτή η λειτουργική ομάδα προσφέρει ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο το οποίο προσβάλλεται από την ανηγμένη γλουταθειόνη (νουκλεόφιλο) σε μια αντίδραση η οποία καταλύεται από τα ένζυμα GST (Σχήμα 1.10). Η προσθήκη της γλουταθειόνης στο μόριο της ξενοβιοτικής ένωσης, λειτουργεί ως μια μοριακή “σημαία”, η οποία επιτρέπει στο συζευγμένο ξενοβιοτικό να απομακρυνθεί από το κύτταρο κατά τη φάση III του μεταβολισμού, μια διαδικασία που απαιτεί τη συμμετοχή πρωτεϊνών-μεταφορέων. Όταν μεταφερθούν εκτός του κυττάρου, τα προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης αποικοδομούνται και στη συνέχεια ακετυλιώνονται ενζυμικά, ώστε να σχηματίσουν παράγωγα συνδεδεμένα με N-ακετυλοκυστεΐνη γνωστά ως μερκαπτουρικά οξέα, τα οποία απεκκρίνονται. Οι GSTs καταλύουν το πρώτο από τα τέσσερα βήματα που απαιτούνται για τη σύνθεση των μερκαπτουρικών οξέων (Boylard and Chasseaud 1969, Jakoby and Habig 1980) (Σχήμα 1.9).

Οι τρανσφεράσες του γλουταθείου διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση ενός ευρέους φάσματος επιβλαβών χημικών που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις ή κυτοτοξικότητα (Coles and Ketterer 1990, Hayes and Pulford 1995). Η ικανότητα των GSTs να καθιστούν χημικά ανενεργές, δυναμικά κυτοτοξικές και γενοτοξικές ενώσεις, αποτελεί το πιο εκτενώς μελετημένο θέμα όσον αφορά τη λειτουργία τους μέσα στο κύτταρο. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν τα καρκινογόνα χημικά που παράγονται από την αφλατοξίνη B1 και το βενζοπυρένιο και σχηματίζονται μετά την ολοκλήρωση της φάσης I του μεταβολισμού των φαρμάκων (Σχήμα 1.10). Σε αυτή την περίπτωση, η σύζευξη της ένωσης με τη γλουταθειόνη οδηγεί στην παραγωγή ενός αβλαβούς μεταβολίτη που απομακρύνεται εύκολα από το κύτταρο.



ΣΧΗΜΑ 1.9. Σύζευξη της γλουταθειόνης και βιοσύνθεση μερκαπτουρικού οξέος.



ΣΧΗΜΑ 1.10. Παραδείγματα αντιδράσεων που καταλύονται από τις GST. Τα υποστρώματα των GST που παρουσιάζονται είναι τα εξής: Α) 1-αφλατοξίνη Β1-8,9-εποξείδιο, Β) βενζυλ-ισοθειοκυανίδιο Γ) διβρωμοαιθάνιο Δ) μηλεϊνυλο-ακετοξικό οξύ Ε) ο-κινόνη.

Ανάμεσα στα υποστρώματα τα οποία καταλύουν οι GSTs μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη, περιλαμβάνονται επίσης αλκυλ- και αρυλ-αλογονίδια, ισοθειοκυανικές ενώσεις, αλογονομένα νιτροβενζόλια, οξείδια αρενίων, κινόνες, και α, β-ακόρεστα καρβονύλια (Keen & Jakoby, 1978, Hayes & Pulford, 1995, Armstrong, 1997, Hayes & McLellan, 1999, Sheehan et al., 2001) (Σχήμα 1.10).

Οι αντιδράσεις αποτοξίνωσης που προαναφέρθηκαν πραγματοποιούνται προς όφελος του ξενιστή καθώς απομακρύνουν τοξικά χημικά από το κύτταρο. Η μοναδική περίπτωση που οι τρανσφεράσες του γλουταθείου αποτελούν ένα εν δυνάμει πρόβλημα για τον ξενιστή, παρά

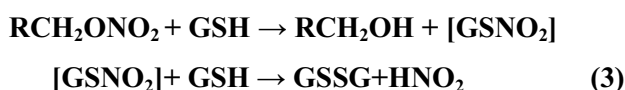
όφελος, είναι στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα αντικαρκινικά φάρμακα φαίνεται να αποτοξινώνονται από τις GSTs όπως τα καρμουςτίνη, χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη, το υδροχλωρίδιο melphalan και η θειοτέπα (Tew 1994, Hayes and Pulford 1995), ενώ φαίνεται ότι η υπερέκφραση των ενζύμων σε καρκινικούς όγκους αποτελεί έναν σπουδαίο μηχανισμό επίκτητης αντίστασης σε χημειοθεραπευτικές ουσίες (ξеноβιοτικά) (Morrow et al., 1998).

Εκτός από την αποτοξίνωση ξеноβιοτικών ενώσεων, υπάρχει και ένας αρκετά μεγάλος αριθμός επιζήμιων ενδογενών ενώσεων που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού και αποτελούν υποστρώματα των GSTs. Επιπρόσθετα της σύνθεσης συζευγμένων με τη γλουταθειόνη προϊόντων, οι GSTs καταλύουν την αντίδραση αναγωγής των ενώσεων που περιέχουν ομάδες υπεροξειδίου, οι οποίες διαφορετικά αποδεικνύονται τοξικές για το κύτταρο (Mannervik 1985). Η παραγωγή δραστικών προϊόντων (υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου, ανιόν σουπεροξειδίου) κατά τις διαδικασίες της αερόβιας αναπνοής (Finkel & Holbrook 2000) αλλά και του οξειδωτικού στρες μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία βιομορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια (και γενικά λιπίδια), βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Άλλωστε, όπως είναι γνωστό, η διαταραχή της ισορροπίας προοξειδωτών και αντιοξειδωτών προς όφελος των πρώτων, καταλήγει σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage). Τα ένζυμα GSTs προστατεύουν από τις ενεργές αυτές ενώσεις, οι οποίες παράγονται *in vivo* σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, απενεργοποιώντας ενδογενείς ακόρεστες αλδεΐδες, κινόνες, εποξειδία και υδροϋπεροξειδία (Bao et al. 1997).

Η δράση υπεροξειδάσης των GST απαιτεί οπωσδήποτε την ύπαρξη γλουταθειόνης. Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης είναι μια ενζυμική αναγωγή του υπεροξειδίου σε μία αλκοόλη με ταυτόχρονη παραγωγή υδροξυλιωμένης γλουταθειόνης (GSOH). Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την αυθόρμητη αντίδραση της GSOH με ένα μόριο GSH προς σχηματισμό νερού και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) (Εξίσωση 1). Παραδείγματα τέτοιου τύπου υποστρωμάτων αποτελούν τα υδρουπεροξειδία των λιπαρών οξέων και των φωσφολιπιδίων (Εξίσωση 2). Οι τρανσφεράσες, επομένως, ασκούν την προστατευτική τους δράση μέσω της ικανότητάς τους να καταλύουν τη σύζευξη του ανηγμένου γλουταθείου με τελικά προϊόντα οξειδωσης. Συνεπώς, οι GST δρώντας και ως υπεροξειδάσες του γλουταθείου (GPXs), μειώνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ανηγμένου γλουταθείου και ανάγουν οργανικά υπεροξειδία λιπαρών και νουκλεϊκών οξέων σε μονουδροξυαλκοόλες. Με τον τρόπο αυτόν, αποτρέπουν την αποικοδόμηση των οργανικών υδρουπεροξειδίων σε κυτοτοξικά αλδευδικά παράγωγα και προστατεύουν τους οργανισμούς από καταπονήσεις (Mannervik 1985).



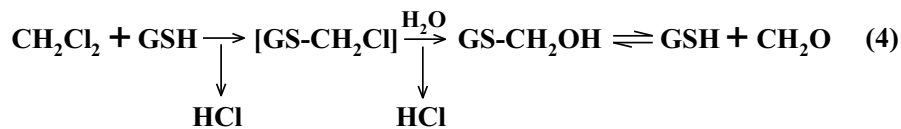
Μία παρόμοια αντίδραση, εξαρτώμενη από τη γλουταθειόνη, είναι η αναγωγή των οργανικών νιτρικών εστέρων σε αλκοόλη και ανόργανο άζωτο (Jakoby and Habig 1980). Στην αρχική αντίδραση το θείο της γλουταθειόνης προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο άτομο αζώτου και στη συνέχεια το ενδιάμεσο συζευγμένο προϊόν (GSNO₂) προσβάλλεται μη ενζυμικά από ένα δεύτερο μόριο GSH (Εξίσωση 3). Οι GSTs καταλύουν επίσης και τις αντίστροφες αντιδράσεις της υδρόλυσης των GSH θειοεστέρων (Dietze et al., 1998, Hederos et al., 2004, Ibarra et al., 2003) Οι αντίστροφες αντιδράσεις εμφανίζουν θεραπευτικό και τοξικολογικό ενδιαφέρον επειδή η παραγωγή γλουταθειόνης και το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο που προκύπτει από το συζευγμένο με τη GSH προϊόν, αποτελούν ένα πιθανό μονοπάτι για τη μεταφορά τοξινών ή φαρμάκων στους ιστούς με ενζυμικές (ένζυμα GST) ή μη ενζυμικές διαδικασίες.



1.5.1.2. GST ΚΑΙ ΒΙΟΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε η σύζευξη μεταξύ της GSH και των ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων σχεδόν πάντα οδηγεί σε ένα συζευγμένο προϊόν που είναι λιγότερο δραστικό από την αρχική ένωση. Ωστόσο, σε ελάχιστες περιπτώσεις, συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή η δράση των GST φαίνεται να οδηγεί σε ένα πιο δραστικό και πιθανότατα τοξικό ενδιάμεσο προϊόν. Οι ενώσεις που από χημικά αδρανείς μετατρέπονται σε χημικά ενεργές (βιοενεργοποίηση-bioactivation) είναι συνθετικές και δεν απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων χημικών είναι τα αλκυλαλογονίδια με μικρή ανθρακική αλυσίδα και δύο λειτουργικές ομάδες, μερικά από τα οποία, κατά τη βιομηχανική εποχή χρησιμοποιούνταν ως εξαιρετικής ικανότητας διαλύτες. Το US NTP (National Toxicology Program) ανακοίνωσε το 1986 ότι το διχλωρομεθάνιο (DCM), ένας διαλύτης ευρέως χρησιμοποιούμενος στο εμπόριο και τη βιομηχανία, αποδείχτηκε καρκινογόνο σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, γεγονός που οδήγησε στις πρώτες τοξικολογικές μελέτες (Green 1997). Οι έρευνες αποκάλυψαν ότι ποντίκια, που φέρουν *gst* γονίδια της *θ* τάξης, είναι ικανά να μεταβολίζουν το DCM. Στις αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στη μεταβολική διαδικασία, η σύζευξη της

GSH με το διχλωρομεθάνιο, οδηγεί στον σχηματισμό ενός υψηλά δραστικού και ιδιαίτερα ασταθούς προϊόντος, της *S*-χλωρομεθυλ-γλουταθειόνης (Εξίσωση 4), το οποίο διατηρεί το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο με ένα άτομο χλωρίου ικανό να προκαλέσει τροποποιήσεις στο DNA (Anders et al., 1988, Dekant et al., 1994).



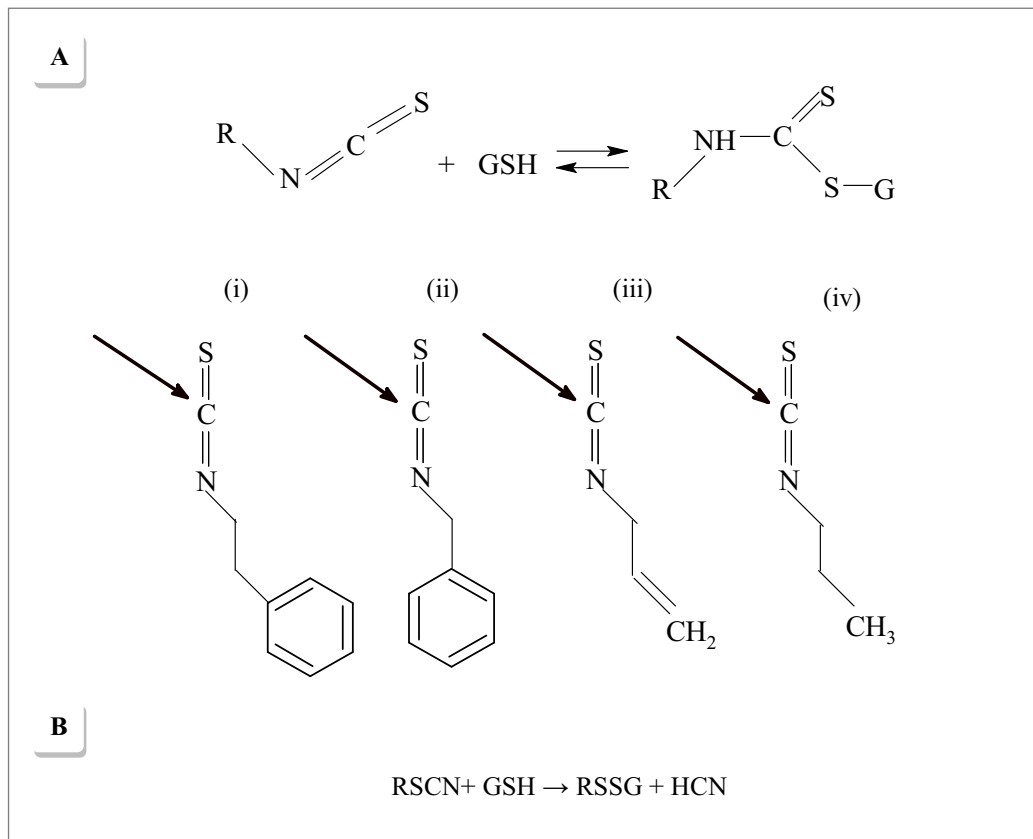
Το διχλωρομεθάνιο, επομένως, αποτελεί ένα ακόμη υπόστρωμα των GSTs που ενεργοποιείται μέσω της σύζευξης με τη γλουταθειόνη και οδηγεί σε γενοτοξικά προϊόντα. Αντίθετα, τα μονουποκατεστημένα αλογονομεθάνια, παρόλο που μπορούν να αντιδρούν μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη (αντίδραση που καταλύεται από GST της θ τάξης), δεν είναι τοξικά για το κύτταρο (Chamberlain et al. 1998).

Η περίπτωση του διχλωρομεθανίου δεν αποτελεί μεμονωμένο γεγονός αφού ένα ακόμη διαλογονοαλκάνιο, το διβρωμοαιθάνιο, μετατρέπεται σε χημικά ενεργή ένωση μέσω υποκατάστασης (van Bladeren 1980) (Σχήμα 1.10). Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις, η σύζευξη της γλουταθειόνης με τα αλογονοαλκάνια, οδηγεί σε τοξικά προϊόντα που δεν οφείλονται σε αυτή καθαυτή τη σύζευξη αλλά προκύπτουν από τον σχηματισμό ενεργών μεταβολιτών που παράγονται από τη σύζευξη με την κυστεΐνη όπως είναι οι ασταθείς θειόλες υπό τη δράση του ενζύμου της β-λυάσης (Anders et al., 1988, Dekant et al., 1994). Τα τεχνητά ηλεκτρονιόφιλα διλειτουργικά (bifunctional) χημικά τα οποία καθίστανται ενεργά μέσω σύζευξης με τα γλουταθειόνη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1. Ενώσεις οι οποίες ενεργοποιούνται από τις GSTs

Τύπος ενεργοποίησης	Κατηγορία ενώσεων	Παραδείγματα
Μεταβολισμός προς σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων	Αλογονομένα αλκάνια Οξειδωμένα αλκάνια	Διχλωρομεθάνιο, διβρωμοαιθάνιο τριχλωροπροπάνιο, διεποξειδίο του βουταδιενίου, διεποξειδίο του ισοπρενίου
Αντιστρεπτές αντιδράσεις	Ισοθειοκυανικές ενώσεις Ισοκυανικές ενώσεις	ισοθειοκυανικό βενζόλιο, ισοθειοκυανικό φαινεθύλιο, ισοθειοκυανικό μεθύλιο, ισοκυανικό N-(1-μεθυλ-3,3-φαινυλ) προπύλιο
<i>β</i> -εξουδετέρωση της οξειδωμένης σουλφρυδολομάδας του συμπλόκου GSH-υποστρώματος	Αδρανή προ-φάρμακα	TER 286
Ενεργοποίηση των συζευγμένων με την κυστεΐνη προϊόντων που παράγονται από τη GSH (αντίδραση εξαρτώμενη από τη <i>β</i> -λύαση)	Αλογονομένα αλκάνια	Εξαχλωροβουταδιένιο, τετραχλωροαιθάνιο

Υπάρχουν επίσης παραδείγματα ενώσεων, όπως είναι οι ισοθειακυανικές ενώσεις που μπορεί αρχικά να αποτοξινώνονται μέσω της σύζευξης με τη γλουταθειόνη, αλλά στη συνέχεια αμφίδρομα επαναπαράγεται το τοξικό ξενοβιοτικό (Baillie & Slatter 1991, Baillie & Kassahun, 1994). Οι ισοθειακυανικές ενώσεις (allyl-, benzyl-, phenethyl-isothiocyanates) αποτελούν μέτριας τοξικότητας ενώσεις που σχηματίζονται από φυτικούς θειογλυκοζίτες (αζωτούχες ενώσεις που περιέχουν θείο στο μόριό τους, το οποίο κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να απελευθερωθεί ως ισοθειοκυανικό ή θειοκυανικό ιόν). Οι ενώσεις αυτές οδηγούν, μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη, σε θειοκαρβαμίδια (Kolm et al., 1995) (Σχήμα 1.11). Μετά την έξοδο τους από το κύτταρο τα θειοκαρβαμίδια αποικοδομούνται αυθόρμητα στις αντίστοιχες ισοθειακυανικές ενώσεις απελευθερώνοντας γλουταθειόνη. Στη συνέχεια, οι ισοθειακυανικές ενώσεις πιθανώς να ληφθούν ξανά από το κύτταρο, να επανασυζευχθούν με τη GSH και να επαναπαραχθούν. Η κυκλική αυτή διαδικασία οδηγεί στη μείωση της ενδοκυτταρικής GSH με αποτέλεσμα να υπάρχει σημαντικός κίνδυνος τοξικότητας για το κύτταρο (Bruggeman et al., 1986).

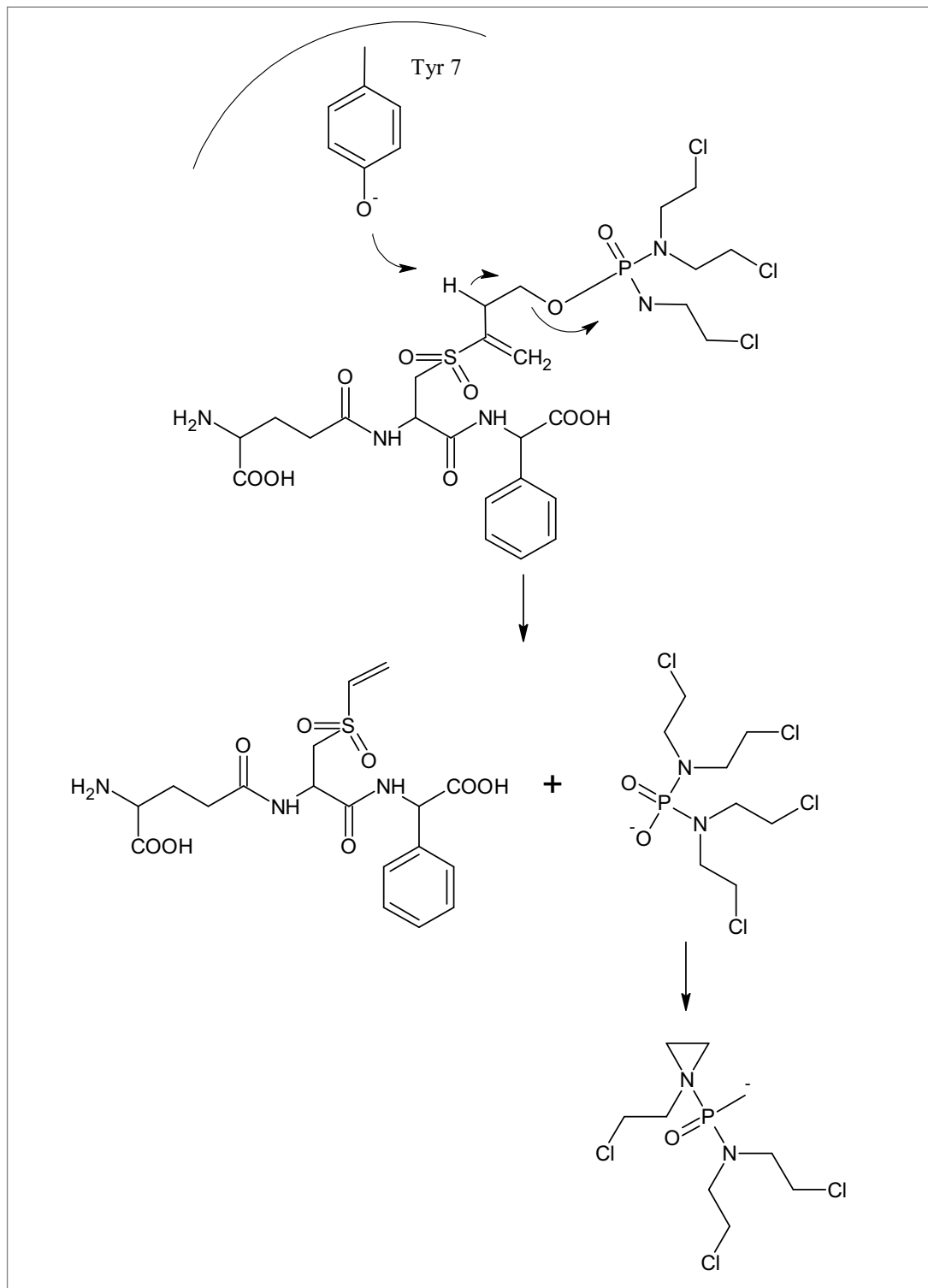


ΣΧΗΜΑ 1.11. **A:** Ενζυμική σύζευξη οργανικών ισοθειοκυανικών ενώσεων: (i) φαινεθυλ- (ii) βενζυλ- (iii) αλλυλ- (iv) μεθυλ-ισοθειοκυανίδια, με τη GSH προς σχηματισμό διθειοκαρβαμιδίων **B:** Οι GSTs καταλύουν την προσβολή της GSH πάνω στο ηλεκτρονιόφιλο άτομο θείου των οργανικών θειοκυανικών ενώσεων.

Η ικανότητα των GST να καθιστούν χημικά ενεργές ορισμένες ενώσεις μετατρέποντας τις σε κυτοτοξικά προϊόντα μπορεί να μην θεωρηθεί μόνο μειονέκτημα, αλλά και εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αδρανές προφάρμακο TLK286 το οποίο ενεργοποιείται από το ένζυμο GSTP1-1 (Morgan et al. 1996, Townsend & Tew, 2003) μέσω μίας αντίδρασης β-απόσπασης η οποία οδηγεί σε ένα προϊόν που αποτελεί το τελικό αλκυλιωτικό μόριο και σε ένα ανάλογο GSH (Σχήμα 1.12). Η σχεδίαση του προφαρμάκου έχει γίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλίσει ότι η αντίδραση ενεργοποίησής του καταλύεται από την Tyr7 του ενεργού κέντρου του ενζύμου GSTP1-1. Το αλκυλιωτικό μόριο αποτελεί μία δραστική ένωση που ανήκει στην ομάδα της αζωτούχου μουστάρδας (Nitrogen Mustard). Η αζωτούχος μουστάρδα μέσω μιας αυθόρμητης αντίδρασης παράγει μια ένωση με ένα αζιριδικό δακτύλιο (Σχήμα 1.12), η οποία μπορεί να αλκυλιώσει το DNA. Η χημική αυτή ένωση έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματική έναντι σε καρκινικά κύτταρα (κυρίως για τα πολύ ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα στους καρκίνους του πνεύμονα και του παχέος εντέ-

ρου) και ήδη έχει ενταχθεί στη φάση των κλινικών δοκιμών. Οι μουστάρδες αζώτου αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες διλειτουργικών αλκυλιωτικών παραγόντων με δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου (Ochoa 1969, Bergsagel et al. 1962, Fisher et al. 1975, Young et al. 1978). Παρά τη μακρόχρονη ιστορία τους (Gillman & Phillips, 1946, Haskel 1990), λίγοι μόνο εκπρόσωποι της συγκεκριμένης κατηγορίας όπως η μεγλωραιθαμίνη (Takimoto & Calvo, 2008), το ισοφωσφαμίδιο (Masurel et al., 1990), το κυκλοφωσφαμίδιο (Rothenberg et al. 2003), η μελφαλάνη (Hillard et al., 2008) και η γλωραμβουκίλη (Rai et al., 2000), χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη έναντι μιας ποικιλίας καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων της νόσου Hodgkin, των μη Hodgkin's λεμφωμάτων, του πολλαπλού μυελώματος, του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του στήθους (Travis et al. 1995).

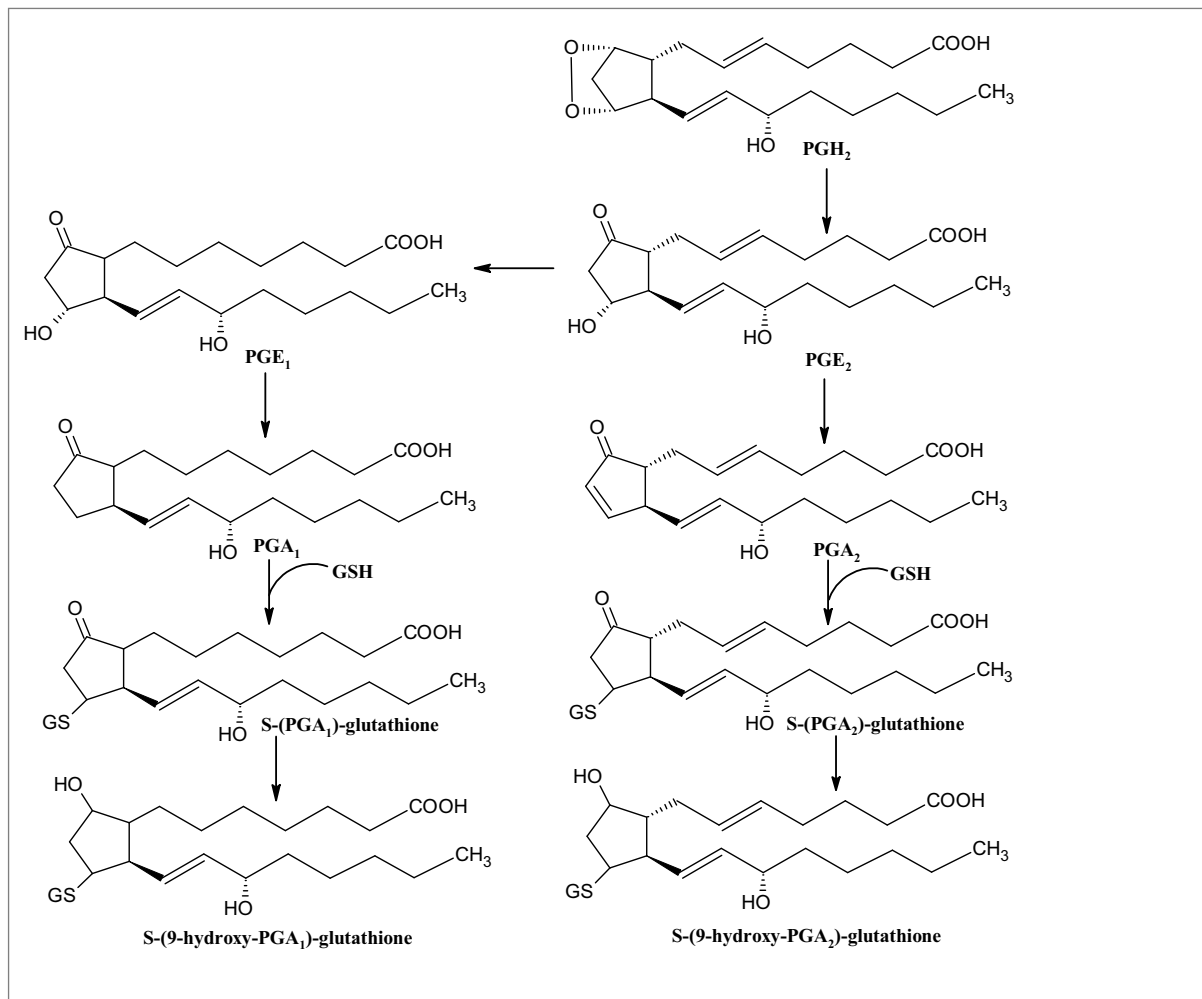
Πολλά ανάλογα μουσταρδών αζώτου μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω ενός συστήματος μεταφοράς (carrier mediated system) και αλκυλιώνουν το DNA το RNA και τις πρωτεΐνες (Goldenberg 1974, Tew & Taylor 1977, Hoes et al. 1999). Η αλκυλίωση του DNA και ειδικότερα ο σχηματισμός διαμοριακών χιαστών δεσμών (interstrand cross-links), θεωρείται υπεύθυνος για την εμφάνιση του υψηλού βαθμού κυτταροτοξικότητας τους (Zwelling et al. 1981, Parsons et al. 1981, Ross et al. 1978).



ΣΧΗΜΑ 1.12. Βιοενεργοποίηση του προφαρμάκου TLK286 από το ένζυμο GSTP1-1. Η Tyr7 αποτελεί το καταλυτικό αμινοξύ (Morgan et al. 1996, Townsend & Tew, 2003).

1.5.1.3. GST ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Πέρα από τον αποξινωτικό τους ρόλο και τη συμβολή τους στην άμυνα των κυττάρων, οι GSTs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνθεση βιολογικά σημαντικών ενδογενών μορίων. Οι τρανσφεράσες της υπεροικογένειας MAPEG δρουν ως συνθάσες του λευκοτριενίου C₄ (LTC₄) το οποίο είναι ένα παράγωγο της γλουταθειόνης, και της προσταγλανδίνης E₂ η οποία και εμπλέκεται σε έναν μεγάλο αριθμό προστατευτικών για τον οργανισμό λειτουργιών (π.χ διατήρηση/προστασία του γαστρικού βλεννογόνου, ρύθμιση της αιμοδυναμικής των νεφρών, συγκόλληση των αιμοπεταλίων).

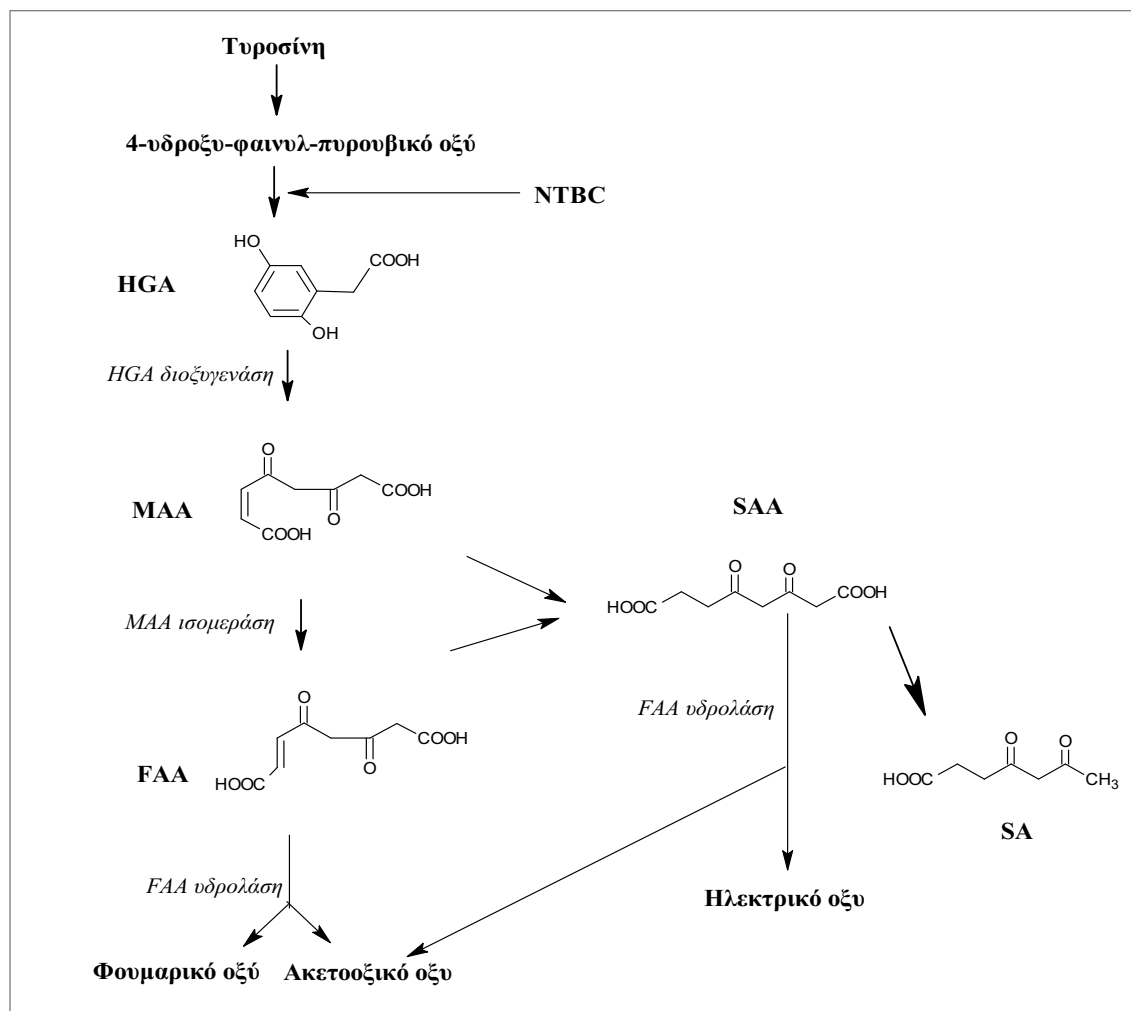


ΣΧΗΜΑ 1.13. Μετατροπή της PGH₂ σε PGE₂ και κατόπιν σε PGE₁. Σύζευξη των PGA₁ και PGA₂ με τη GSH και αναγωγή της κετοομάδας προς σχηματισμό των αντίστοιχων (9-hydroxyl-PGA)-GSH συζευγμένων προϊόντων.

GSTs της α και σ τάξης έχει διαπιστωθεί ότι καταλύουν τη σύνθεση της προσταγλανδίνης F_{2α} και της προσταγλανδίνης D₂ αντίστοιχα, ενώ τρανσφεράσες του γλουταθειού της α, μ και π

τάξης καταλύουν τη σύζευξη των προσταγλανδινών PGA_1 και PGA_2 με τη γλουταθειόνη (Bogaards et al., 1997, Urade et al., 1999b) (Σχήμα 1.13). Ορισμένα μέλη της οικογένειας των διαλυτών GSTs εμπλέκονται επίσης στη βιοσύνθεση και άλλων προστανοειδών των οποίων η βιολογική δράση είναι πολύπλευρη, ωστόσο σημαντικότερος ρόλος τους είναι εκείνος που σχετίζεται με την εμφάνιση και εξέλιξη των φλεγμονών.

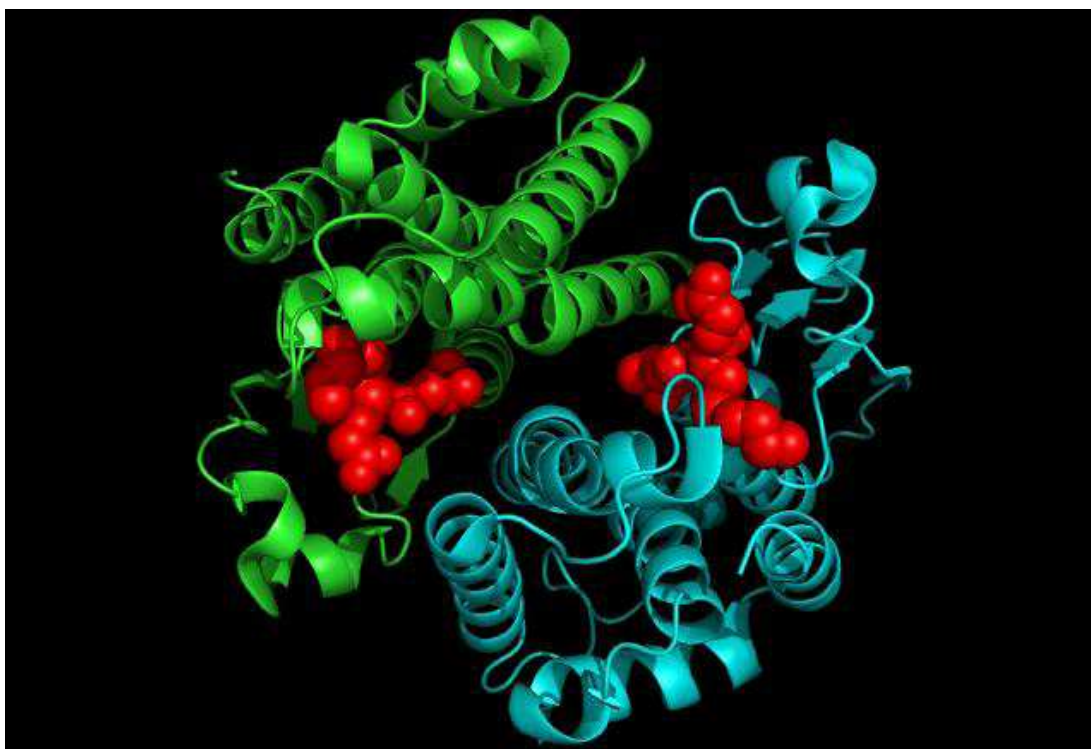
Οι GSTs δεν εμπλέκονται μόνο στη βιοσύνθεση των προστανοειδών αλλά συνεισφέρουν στον μεταβολισμό και άλλων ενδογενών ενώσεων. Η ζ τάξης GST γνωστή και ως ισομεράση του μαλειλακτοοξικού οξέος, παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της τυροσίνης (Fernandez-Canon & Penalva, 1998) (Σχήμα 1.14). Δυσλειτουργίες του συγκεκριμένου μεταβολικού μονοπατιού μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις στο συκώτι, τους νεφρούς και το περιφερικό νευρικό σύστημα.



ΣΧΗΜΑ 1.14. Η αποικοδόμηση της τυροσίνης κατά την οποία λαμβάνει χώρα ισομερείωση του μηλείνυλο-ακετοξικού σε φουμαρυλο-ακετοξικό οξύ.

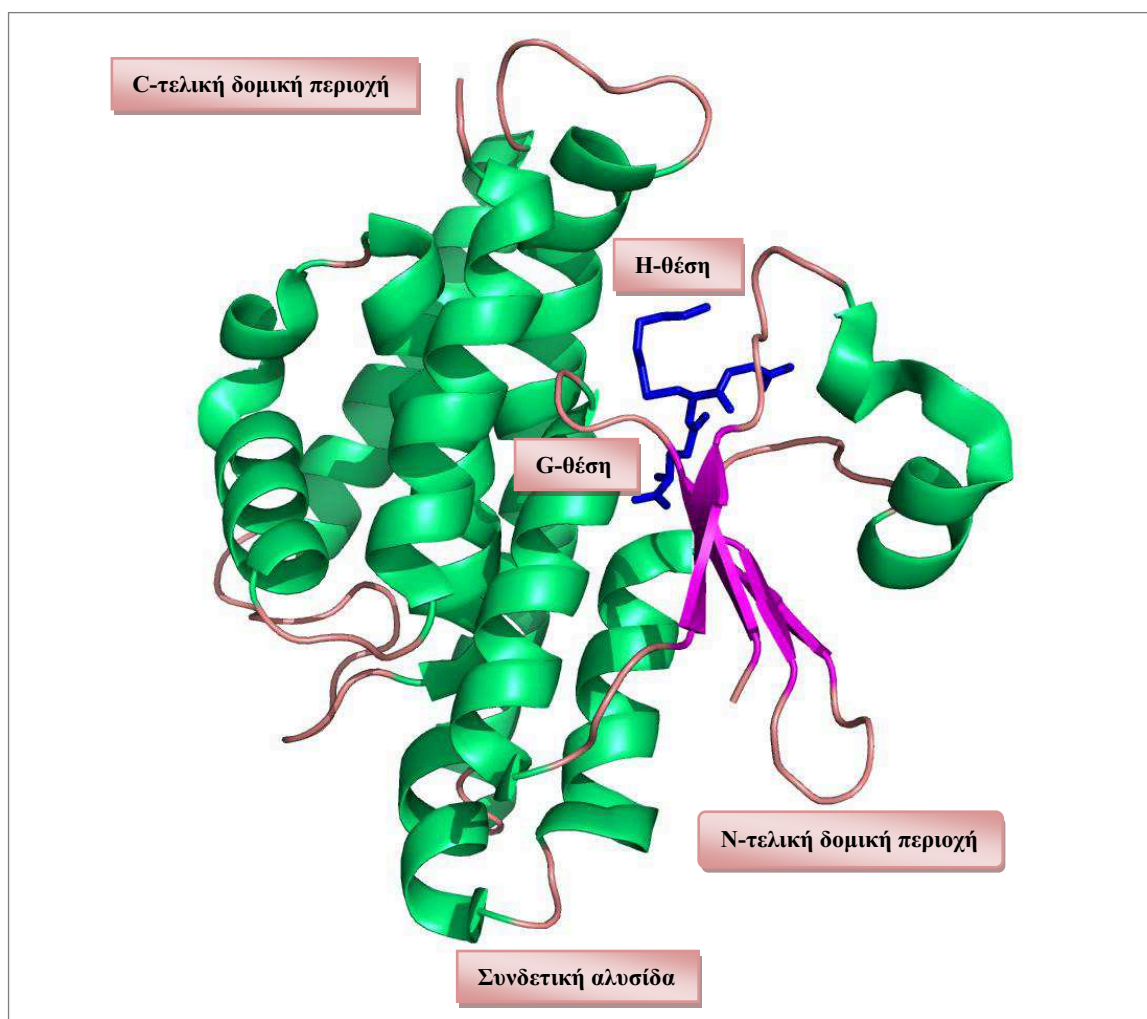
1.6. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTS

Από δομικής άποψης, οι κυτταροπλασματικές διαλυτές GSTs είναι διμερή ένζυμα και οι δύο υπομονάδες, βάρους 22-27 kDa η καθεμία, σχετίζονται μεταξύ τους με έναν δευτέρης τάξης άξονα συμμετρίας. Κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό κέντρο που αποτελείται από δύο δομικές περιοχές, τη θέση δέσμευσης της γλουταθειόνης (G-θέση) και τη θέση δέσμευσης των υδρόφοβων υποστρωμάτων (H-θέση) (Σχήμα 1.15) (Mannervik et al., 1978). Η G-θέση αποτελείται από μια συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N-terminal). Η H-θέση, αντιθέτως, εντοπίζεται στο καρβοξυλικό άκρο (C-terminal) της πρωτεΐνης και διαθέτει μια υψηλής παραλλακτικότητας αμινοξική αλληλουχία. Εξαιρέση στη διμερή αυτή μορφή αποτελούν οι πρωτεΐνες DHAR και λ κλάσης, οι οποίες περιλαμβάνουν μονομερείς πρωτεΐνες, ενώ δομικές λεπτομέρειες για τις φυτικές μικροσωμικές GSTs δεν είναι ακόμη γνωστές.



ΣΧΗΜΑ 1.15. Άποψη της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου της δ τάξης *adGSTD4-4* από το έντομο *Anopheles dirus* (Wongsantichon et al. 2010), σχεδιασμένη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002). Διακρίνονται τα δύο μονομερή (με γαλάζιο και πράσινο χρώμα) και τα δεσμευμένα μόρια του S-εξυλο-γλουταθειού (με σφαίρες κόκκινου χρώματος) σε κάθε μονομερές.

Παρά τις μεγάλες διαφορές στις αμινοξικές αλληλουχίες των διαφορετικών κυτταροπλασματικών GSTs, όλα τα ισόενζυμα έχουν παρόμοια πρωτεϊνική αναδίπλωση αποτελούμενη από δυο περιοχές. Την N-δομική ενότητα, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 1/3 της πρωτεΐνης, περιέχει τη G-θέση και συνιστά ένα βαβαββα δομικό μοτίβο. Αυτή η αναδίπλωση, παρόμοια με αυτή της θειορεδοξίνης, συναντάται σε αρκετές πρωτεΐνες από διαφορετικές οικογένειες ενζύμων που φαίνεται να εμπλέκονται στη δέσμευση της γλουταθειόνης ή της κυστεΐνης (Armstrong, 1997). Η C-δομική ενότητα αποτελείται από α-έλικες και σχηματίζει τη Η-θέση (Dirr et al., 1994, Armstrong, 1997) (Σχήμα 1.16). Οι δύο δομικές ενότητες, συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας συνδετικής περιοχής αποτελούμενης από 5-10 αμινοξέα, της οποίας η αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα.

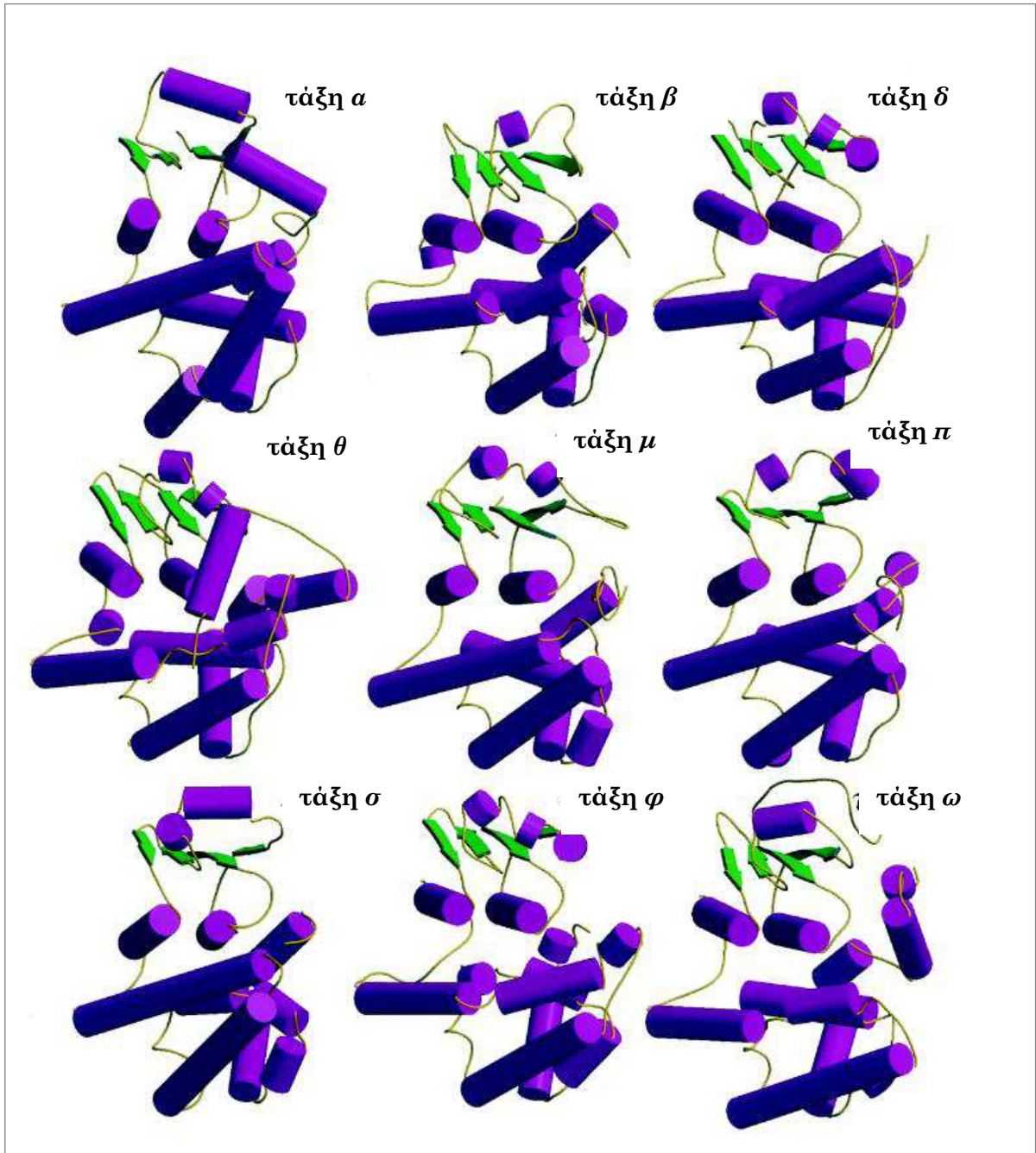


ΣΧΗΜΑ 1.16. Παρουσίαση του μονομερούς της πρωτεΐνης *adGSTD4-4* από το έντομο *Anopheles dirus* (Wongsantichon et al. 2010), όπου διακρίνονται η N-τελική περιοχή που περιέχει τη G-θέση και η C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης με την Η-θέση. Μία συνδετική αλυσίδα 5-10 αμινοξέων ενώνει την αμινοτελική με την καρβοξυλική περιοχή του ενζύμου. Το σχήμα παρήχθη χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyMOL (Delano, 2002).

Μελέτη και ανάλυση των πρωτεϊνικών δομών έδειξαν ότι η γλουταθειόνη δεσμεύεται με παρόμοιο τρόπο στα διαφορετικά ένζυμα GSTs. Αντιθέτως, η παραλλακτικότητα του καρβοξυλικού άκρου και κατά συνέπεια της δομής της Η-θέσης, που ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των τάξεων, ακόμη και εντός της ίδιας τάξης, είναι αυτή που επιτρέπει την πρόσδεση μεγάλης ποικιλίας και εύρους υποστρωμάτων και συμμετέχει στον καθορισμό της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα (Armstrong, 1997, Basantani and Srivastana, 2007). Ακόμη και αν η συνολική τοπολογία είναι παρόμοια ανάμεσα στις διαλυτές GSTs (Σχήμα 1.17), κάποιες δομικές λεπτομέρειες διαφέρουν. Οι GSTs της α και θ τάξης χαρακτηρίζονται από μια επιπλέον α-έλικα στη C-τελική περιοχή και της μ τάξης έχουν έναν επιπλέον βρόγχο. Και τα δύο αυτά δομικά στοιχεία βρίσκονται κοντά στις θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και φαίνεται να συμβάλλουν στον σχηματισμό ενός πιο περιορισμένου σε όγκο ενεργού κέντρου για τα ένζυμα της α , μ και θ τάξης σε σύγκριση με τα ένζυμα τα οποία ανήκουν στην π και σ τάξη (Armstrong, 1997; Rossjohn et al., 1998).

Πρόσφατα, οι Atkinson & Babbitt (2009), πρότειναν τον περαιτέρω διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών GSTs σε δυο μεγάλες υπο-ομάδες. Τα κριτήρια στα οποία βασίστηκαν για την ομαδοποίηση αυτή ήταν οι ομοιότητες στο γενικό αμινοξικό και δομικό προφίλ των κυτταροπλασματικών GSTs και οι διαφορές στην οργάνωση και σύνθεση των ενεργών κέντρων τους. Οι κυτταροπλασματικές GSTs στο σύνολο τους έχουν παρόμοια δομή αλλά μεταξύ τους οι τάξεις που πρώτες ανακαλύφθηκαν και που συναντώνται σχεδόν αποκλειστικά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, δηλαδή οι α , μ , π και σ τάξεις (Y-GSTs) παρουσιάζουν σημαντικά περισσότερες ομοιότητες συγκριτικά με τις GSTs της δεύτερης υπο-ομάδας (S/C-GSTs) που περιλαμβάνει τις τάξεις φ , τ , θ , ζ , ω και β . Οι τάξεις των ευκαρυωτικών οργανισμών που προαναφέρθηκαν, σύμφωνα με τους Atkinson & Babbitt (2009), αποτελούν τις Y-GSTs και ονομάζονται πρωτεΐνες τύπου τυροσίνης αφού χαρακτηρίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιας τυροσίνης η οποία εντοπίζεται στο τέλος της πρώτης β-στροφής (B1) και της γλουταθειόνης. Τη δεύτερη μεγάλη υπο-ομάδα αποτελούν οι S/C-GSTs ή αλλιώς πρωτεΐνες τύπου σερίνης/κυστεΐνης και χαρακτηρίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιας σερίνης ή κυστεΐνης η οποία εντοπίζεται μερικές θέσεις μετά στο κάμινο-τελικό άκρο της έλικας 1 (H1) και της γλουταθειόνης. Οι S/C-GSTs απαντώνται σε όλα τα είδη των οργανισμών εκτός από τα αρχαία τα οποία δεν διαθέτουν μηχανισμό σύνθεσης της γλουταθειόνης (Copley & Dhillon 2002). Οι διαφορές στην αλληλουχία και τη δομή μεταξύ των Y-GSTs και S/C-GSTs έγκειται εν μέρει στο αμινοξικό κατάλοιπο που αλληλεπιδρά απευθείας με τη νουκλεόφιλη σουλφυδρυλομάδα της GSH. Οι αλλαγές τόσο στη θέση όσο και στη χημική συμπεριφορά του καταλοίπου σε σχέση με την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, προκαλούν μεταβολές στον καταλυτικό μηχανισμό της. Σαφέστατα, υπάρχουν σημαντικές διαφορές που χαρακτηρίζουν ακόμη και μεταξύ τους τις παραπάνω τάξεις, όπως για παράδειγμα μία επιπλέον έλικα στο

ενεργό κέντρο στην α τάξη (Sinning et al. 1993) και μια κοινή υδρόφιλη επιφάνεια επαφής των δύο μονομερών στη σ τάξη (Jowsey et al., 2001). Παρόλα αυτά, αν κανείς δει τις πρωτεΐνες αυτές στο σύνολο των κυτταροπλασματικών GSTs, των ενζύμων της πολυπληθέστερης οικογένειας των τρανσφερασών του γλουταθειού, συμπεραίνει ότι είναι στενά συνδεδεμένες παρά τις διαφορές τους.



ΣΧΗΜΑ 1.17. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών δομών των ενζύμων GSTs. Παρουσιάζονται οι δομές των ενζύμων των τάξεων α , μ , π , σ , θ και ω που έχουν εντοπιστεί σε θηλαστικά και των τάξεων β , δ και φ που έχουν ταυτοποιηθεί σε βακτήρια, έντομα και φυτά, αντίστοιχα (Board et al. 2000).

1.7. ΦΥΤΙΚΕΣ GSTS

Οι φυτικές τρανσφεράσες της γλουταθειόνης αποτελούνται από κυτταροπλασματικές και μικροσωμικές πρωτεΐνες. Αρχικά, με βάση τη δομή των γονιδίων ταξινομήθηκαν σε τέσσερις τύπους ομάδων (I, II, III και IV) (Dixon et al. 1998a), αλλά αργότερα υποδιαιρέθηκαν σε οχτώ ξεχωριστές τάξεις, επτά από τις οποίες αντιπροσωπεύονται από διαλυτές GST (ϕ , ζ , τ , θ , λ , DHAR και TCHQD) και μία τάξη από μικροσωμικές GST (Edwards and Dixon, 2005). Η χρήση ελληνικών γραμμάτων για την ονομασία των GST προτάθηκε από τους Edwards et al. (2000) και σύμφωνα με αυτή η ονοματολογία των GST γονιδίων ξεκινά με τη συντομογραφία για το γένος και το είδος του φυτού, ακολουθεί η λέξη GST (Glutathione-S-Transferase) και στο τέλος ανάλογα με την τάξη τα γράμματα F π.χ (για την τάξη ϕ), U (για την τ), Z (για την ζ), T (για την θ) κ.ο.κ.

Οι φυτικές GST έχουν κυρίως μελετηθεί ως προς το ρόλο τους στην αποτοξίνωση των ζιζανιοκτόνων. Στις συγκεκριμένες αντιδράσεις αποτοξίνωσης δρουν ως κύρια αποτοξινωτικά ένζυμα στη φάση II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ενώσεων μαζί με τις γλυκοζυλτρανσφεράσες. Τα φυτά εμφανίζουν ανθεκτικότητα ως προς έναν μεγάλο αριθμό ξενοβιοτικών εξαιτίας της ευρείας εξειδίκευσης των GST σε ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Οι φυτικές θ και ζ GSTs εμπλέκονται περισσότερο στον ενδογενή μεταβολισμό και λιγότερο στην διαδικασία αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών. Οι πρωτεΐνες της λ τάξης και η αναγωγή της αφυδροασκορβάση (DHAR, dehydroascorbate reductase) λειτουργούν περισσότερο ως οξειδοορεδοκτάσες παρά ως πρωτεΐνες σύζευξης.

1.7.1. ΟΙ ϕ ΚΑΙ τ ΤΑΞΕΙΣ

Οι GSTs της ϕ και τ τάξης συναντώνται αποκλειστικά στους φυτικούς οργανισμούς και είναι οι πιο πολυπληθείς. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα σύζευξης πολλών και διαφορετικών ξενοβιοτικών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι παρόμοια, από λειτουργική άποψη, με τις GSTs που συναντώνται στους ζωικούς οργανισμούς και εμπλέκονται στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών (Edwards and Dixon, 2005). Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση, τα ένζυμα της ϕ τάξης αποτελούν τις GSTs Τύπου I (Type I) και της τ τάξης Τύπου III (Type III). Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν επίσης στον ενδογενή κυτταρικό μεταβολισμό (Dixon et al., 1998b) δρώντας ως υπεροξειδάσες του γλουταθείου (GPOXs) οι οποίες αντιδρούν στο οξειδωτικό στρες, ως πρωτεΐνες δέσμευσης των φλαβονοειδών (Mueller et al., 2000) και ως ρυθμιστές στη διαδικασία της απόπτωσης (Kampranis et al. 2000).

Ένζυμα από τις δύο αυτές τάξεις τα οποία επιτελούν ποικίλες λειτουργίες, έχουν χαρακτηριστεί από διάφορα φυτικά είδη. Πρόσφατα, οι Zeng et al. (2005) δημοσίευσαν την πρώτη κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό μιας GST από γυμνόσπερμα. Το γονίδιο που κλωνοποιήθηκε από το *Pinus tabulaeformis* Carr., ανήκει στην τ τάξη GST. Σε μία άλλη μελέτη, οι Nuticati et al. (2006) ανέφεραν την επαγωγή δυο GST γονιδίων, του *AtGSTF9* της φ τάξης και του *AtGSTU26* της τ τάξης, από το *A. thaliana* με τη μέθοδο RT-PCR. Παρόλο που και τα δύο ένζυμα που προέκυψαν, καταλύουν την κλασική αντίδραση σύζευξης GSH-CDNB, δεν φαίνεται να εμφανίζουν δραστικότητα όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το *p*-nitrobenzylchloride. Το *AtGSTF9* εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, ενώ το *AtGSTU26* δεν εμφανίζει δράση GPOX αλλά φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένη δραστικότητα ως προς τα χλωρακεταμιδικά ζιζανιοκτόνα, alachlor και metolachlor.

Συμπερασματικά, οι μελέτες που αφορούν τις φ και τ τάξης GST αντανακλούν την αξιοσημείωτη πολυλειτουργικότητα των ενζύμων αυτών είτε αφορά την προστασία των φυτών από εξωγενείς παράγοντες είτε το ρόλο τους στη διατήρηση της λεπτής μεταβολικής ισορροπίας που απαιτείται ενδοκυτταρικά για την φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη του φυτού.

1.7.2. ΟΙ ζ ΚΑΙ θ ΤΑΞΕΙΣ

Οι GSTS της ζ (Type II) και θ (Type IV) τάξης είναι συντηρημένες στους ζωικούς οργανισμούς και στα φυτά και έχουν πολύ περιορισμένη δράση έναντι των ξενοβιοτικών. Τα ένζυμα της θ τάξης λόγω της GPOX δράσης τους μειώνουν τα επίπεδα των υδρουπεροξειδίων που παράγονται κατά την οξειδωτική καταπόνηση. Οι ζ τάξης GST εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της τυροσίνης καταλύοντας, την εξαρτώμενη από τη γλουταθειόνη αντίδραση μετατροπής του μηλεϊνυλο-ακετοξικού σε φουμαρυλο-ακετοξικό οξύ, δρουν επομένως ως ισομεράσες εξαρτώμενες από το γλουταθείο. Τα γονίδια της ζ τάξης συναντώνται τόσο στα φυτά όσο και στους ανθρώπους, ενώ σε πρόσφατες μελέτες οι McGonigle et al. (2000) ταυτοποίησαν δυο GST αλληλουχίες ζ τάξης στον αραβόσιτο και τη σόγια, ενώ οι Chen et al. (2003) κλωνοποίησαν δυο GST της ζ τάξης από τα *A. thaliana* και *Brassica napus* L. χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT-PCR. Τα κλωνοποιημένα γονίδια εκφράστηκαν τόσο *in vivo* (*E. coli*) όσο και *in vitro* (wheat-germ cell-free protein synthesis system) και έδειξαν δραστικότητα έναντι του διχλωροοξικού οξέος (αποχλωρίωση) αλλά και δράση ισομεράσης του μηλεϊνυλο-ακετοξικού οξέος. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Tsuchiya et al. (2004), ερεύνησαν τη δομή και έκφραση δυο GST γονιδίων της ζ τάξης (*OsGSTZ1* και *OsGSTZ2*) τα οποία εντοπίστηκαν στο χρωμόσωμα 12 στο ρύζι. Διαπιστώθηκε ότι και τα δυο γονίδια περιέχουν εννιά κωδικοποιημένα εξόνια ενώ η περιοχή που εντοπίζεται στα όρια εξωνίων και εσωνίων (intron-exon boundaries) είναι αυστηρά συντηρημένη ανάμεσα στα δύο γονίδια. Οι αμινοξικές αλληλου-

χίες των γονιδίων εμφανίζουν ομοιότητα 77.1% μεταξύ τους ενώ το δομικό μοτίβο SSCXWRVRIAL των GSTs της ζ τάξης εντοπίζεται στις N-τελικές περιοχές και στις δύο πρωτεΐνες.

1.7.3. DHAR και λ ΤΑΞΗΣ GSTs

Οι DHAR και λ τάξης GSTs λειτουργούν ως θειολτρανσφεράσες ανάγοντας το διυδροασκορβικό οξύ σε ασκορβικό και για αυτόν τον λόγο χαρακτηρίζονται ως οξειδοαναγωγάσες παρά ως τρανσφεράσες. Η αμινοξική αλληλουχία DHAR που βρέθηκε στο ρύζι (Urano et al., 2000) χρησιμοποιήθηκε από τους Dixon et al. (2002) προκειμένου να μελετηθεί το γονιδίωμα του *A. thaliana*. Ταυτοποιήθηκαν τέσσερις σχετικές πρωτεΐνες από το συγκεκριμένο στέλεχος (*AtDHAR1*, *AtDHAR2*, *AtDHAR3*, *AtDHAR4*) ενώ οι ανασυνδυασμένες *AtDHARs* πρωτεΐνες φάνηκε να μην εμφανίζουν καμία ανιχνεύσιμη δραστικότητα έναντι των τυπικών ξενοβιοτικών υποστρωμάτων των GST όπως είναι τα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο, 4-νιτροβενζοϋλοχλωρίδιο, ισοθειοκυανικό βενζύλιο αλλά ούτε και δράση GPOX ή απαλογονασών. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το 2-υδροξυεθυλδισουλφίδιο, το σύνολο των *AtDHARs*, εμφάνισε δράση θειολτρανσφεράσης. Οι DHAR μπορεί να εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα πλαστίδια των χλωροπλαστών. Η GST που απομονώθηκε από ρύζι και χαρακτηρίστηκε από τους Urano et al. (2000) θεωρείται κυτταροπλασματική, ενώ η πρωτεΐνη DHAR η οποία απομονώθηκε από σπανάκι και ταυτοποιήθηκε θεωρείται πλαστιδιακή (Shimaoka et al., 2000).

Οι Dixon et al. (2002) μελετώντας το γονιδίωμα του *A. thaliana* ταυτοποίησαν δυο ακόμη GSTs, των οποίων οι αλληλουχίες ήταν παρόμοιες με τις θηλαστικές GSTs της ω τάξης, και οι οποίες ταξινομήθηκαν ως λ τάξης ένζυμα. Οι καθαρές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, δεν είχαν δράση GPOX ή DHAR, επιπλέον δεν εμφάνιζαν ικανότητα σύζευξης με το γλουταθείο και δεν παρουσίαζαν δράση απαλογονάσης. Ωστόσο και τα δύο ένζυμα συμπεριφέρονταν ως θειολτρανσφεράσες όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το 2-υδροξυεθυλ δισουλφίδιο. Οι κυτταροπλασματικές DHARs και λ τάξης GSTs διαδραματίζουν επίσης αντιοξειδωτικό ρόλο όπως έδειξαν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ρίζες του *A. thaliana* μετά την έκθεση τους σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και χημικά.

1.7.4. TCHQD GSTs

Μέχρι σήμερα μόνο ένα γονίδιο που ανήκει στην τάξη TCHQD των GST έχει ταυτοποιηθεί στο γονιδίωμα του *A. thaliana* (Gen-Bank Accession No. At1g77290). Η συγκεκριμένη πρω-

τεΐνη δεν έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά, αλλά θεωρείται ότι παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με ένζυμα προκαρυωτικά (Edwards and Dixon 2005).

1.7.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ GSTs

Η οργάνωση των γονιδίων των φυτικών GST και ο εντοπισμός της θέσης των χρωμοσωμάτων πολλών GST γονιδίων είναι πλέον γνωστά (Edwards et al. 2000). Η τάξη φ αποτελεί μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες των GSTs στην οποία συμπεριλαμβάνονται μόνο φυτικές πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό των ενζύμων αυτών είναι ότι φέρουν 1 ιντρόνιο και 3 εξώνια. Οι πρωτεΐνες της τάξης ζ βρίσκονται εγγύτερα ως προς τις θηλαστικές τάξης ζ και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν φέρουν 2 ιντρόνια και 10 εξώνια. Οι GSTs της τ τάξης περιέχουν 2 ιντρόνια και 2 εξώνια και κυριαρχούν αριθμητικά σε όλα τα δικοτυλήδονα. Στις πρωτεΐνες της θ τάξης περιλαμβάνονται πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια του είδους *Arabidopsis thaliana* και είναι όμοιες με τις θηλαστικές τάξης θ . Ωστόσο, ενώ οι ομόλογες θηλαστικές φέρουν 4 ιντρόνια, οι φυτικές φέρουν 5 ιντρόνια, 2 εκ των οποίων βρίσκονται στις ίδιες θέσεις με αυτές των θηλαστικών.

1.7.6. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τυπικά οι GSTs έχουν μοριακές μάζες περίπου 50 kDa και αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες (ομοδιμερές) ή μη πανομοιότυπες (ετεροδιμερές) πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Σύμφωνα με τους Edwards and Dixon (2005) οι φ -, τ -, θ - και ζ -τάξης GSTs είναι διμερείς πρωτεΐνες και χαρακτηρίζονται από ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο. Η TCHQD πρωτεΐνη πιθανότατα να έχει και αυτή μια καταλυτική σερίνη στο ενεργό κέντρο. Οι DHAR και λ τάξης GSTs διαφοροποιούνται από τα ένζυμα αυτά επειδή είναι μονομερείς και έχουν μια καταλυτική κυστεΐνη στο ενεργό κέντρο. Η ικανότητα σχηματισμού ετεροδιμερών αυξάνει σημαντικά την ποικιλότητα των φυτικών GSTs. Θεωρείται μάλιστα ότι οι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες πιθανόν αναγνωρίζουν συγκεκριμένα φυτοχημικά ή εμφανίζουν μοναδικές κινητικές ιδιότητες απαραίτητες για τη διαχείριση των μεταβολιτών (Edwards et al., 2000). Πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή των φυτικών GST προέρχονται από μελέτες στα ένζυμα της φ (Reinemer et al., 1996) και ζ τάξης (Thom et al., 2001) που απομονώθηκαν από το *A. thaliana* και τον αραβόσιτο (Neuefeind et al., 1997a, 1997b) καθώς και από GSTs της τ τάξης, από σιτάρι (Thom et al., 2002), σόγια (Axarli et al. 2009) και από το *P. Tabulaeformis*, ένα είδος πεύκης (Zeng & Wang, 2005, Zeng et al., 2005). Οι πρωτεϊνικές δομές των ενζύμων αυτών είναι παρόμοιες παρά την πολύ μεγάλη απόκλιση στις αμινοξικές αλληλουχίες των GST μεταξύ των διαφορετικών τάξεων.

Κάθε υπομονάδα μιας διμερούς GST πρωτεΐνης περιέχει ένα ανεξάρτητο καταλυτικό/ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο αποτελείται από δύο θέσεις την G- και H- θέση. Η G-θέση αποτελείται από μία συντηρημένη ομάδα αμινοξέων, τοποθετείται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και εξειδικεύεται στη δέσμευση της GSH ή άλλων GSH ομολόγων. Επιπλέον διευκολύνει τον σχηματισμό του καταλυτικά ενεργού θειολικού ανιόντος της GSH (Edwards et al., 2000). Η περιοχή η οποία αποτελείται από μία μεταβλητή αμινοξική αλληλουχία βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Δεσμεύει τα υδρόφοβα υποστρώματα κατά την καταλυτική διαδικασία, ενώ η υψηλά μη συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία στο καρβοξυ-τελικό άκρο επιτρέπει την αποδοχή και χρησιμοποίηση ενός εύρους υδρόφοβων ενώσεων ως υποστρωμάτων. Επιπρόσθετα, η θέση, συνεισφέρει τα περισσότερα καταλυτικά αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία αλληλεπιδρούν με το δεύτερο υδρόφοβο υπόστρωμα. Διαφορές στο καρβοξυ-τελική περιοχή μπορεί να ευθύνονται για διαφορές στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων μεταξύ των διαφορετικών GST τάξεων (Sheehan et al., 2001). Τα N- και C-τελικά άκρα συνδέονται μεταξύ τους με μία συνδετική περιοχή 5-10 αμινοξέων. Οι τρισδιάστατες πρωτεϊνικές δομές των ενζύμων GST αποκαλύπτουν ότι οι G- και H-θέσεις εμφανίζουν μία σχετική κινητικότητα γεγονός που πιθανότατα οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση των υπομονάδων μετά τη δέσμευση του υποστρώματος. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό γιατί οι διαλυτές GSTs συνιστούν ομοδιμερή ακόμη και όταν κάθε υπομονάδα ενός ενζύμου είναι καταλυτικά ανεξάρτητη (Dixon et al, 2002).

Η δέσμευση και ο σωστός προσανατολισμός της GSH, φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την καταλυτική διαδικασία και σαφέστατα επηρεάζονται από την G-θέση (Dixon et al. 2002). Η G-θέση προωθεί τον ιονισμό της σουλφρυλομάδας της GSH που με τη σειρά της οδηγεί στον σχηματισμό ενός ενεργού θειολικού ανιόντος μέσω ενός υδρογονικού δεσμού με την παρακείμενη υδροξυλομάδα. Στις φυτικές GST την λειτουργία αυτή επιτελεί ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης. Η πιο ευμετάβλητη H θέση, ευθύνεται για τη δέσμευση ενός εύρους υδρόφοβων υποστρωμάτων ποικίλων χημικών δομών. Η κινητική μελέτη των ενζύμων όσον αφορά τη σύζευξη της GSH με πρότυπα υποστρώματα, υπέδειξε ότι ο μηχανισμός που ακολουθείται για τη δέσμευση των υποστρωμάτων είναι μηχανισμός «τυχαίας διαδοχής δυο υποστρωμάτων, δυο προϊόντων» (Labrou et al., 2001). Η συνολική ταχύτητα της αντίδρασης, επομένως, προσδιορίζεται από τον ρυθμό απελευθέρωσης του προϊόντος από το ενεργό κέντρο.

Η γνώση των τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών και της αρχιτεκτονικής των ενεργών κέντρων των ενζύμων GST υπήρξε αρωγός στην ανάπτυξη ενζύμων με αυξημένη δραστηριότητα έναντι των ξενοβιοτικών, επιτρέποντας στους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς που προέκυπταν, να αποκτούν βελτιωμένη ενζυμική δράση έναντι μιας συγκεκριμένης ξενοβιοτι-

κής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δημιουργία ενός GST γονιδίου που προήλθε από τον συνδυασμό τεχνικών κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και DNA shuffling (Dixon et al. 2003). Το καινούριο γονίδιο ήταν χίμαιρα δυο GST γονιδίων της τ τάξης από αραβόσιτο ενώ η σημειακή μετάλλαξη που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την αντικατάσταση μιας γλουταμίνης από μια λευκίνη. Το χιμαιρικό γονίδιο εμφάνισε αυξημένη δραστηριότητα έναντι του ζιζανιοκτόνου fluorodifen κατά 29-φορές. Τα διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana* που μετασηματίστηκαν με αυτό το γονίδιο εμφάνισαν υψηλότερη ανθεκτικότητα έναντι του συγκεκριμένου ζιζανιοκτόνου, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης τους δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Η αντικατάσταση του αμινοξικού καταλοίπου της γλουταμίνης με αυτό της λευκίνης έδειξε ότι ευνοείται η δέσμευση του συγκεκριμένου διφενυλαιθέρα (fluorodifen) στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης.

1.8. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ GSTS

Η πρώτη ένδειξη παρουσίας GSTs σε βακτήρια αναφέρθηκε από τον Takashi Shishido όταν εντοπίστηκε GST δραστηριότητα στο βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* (Shishido 1981). Από τότε, ένζυμα GSTs έχουν βρεθεί σε πολλούς αερόβιους πρωκαρυωτικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων παθογόνων, για τον άνθρωπο και τα φυτά, μικροοργανισμών και βακτηρίων του εδάφους. Αντιθέτως, μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί GSTs σε αναερόβια βακτήρια (Piccolomini 1991) ή σε Αρχαία, την άλλη ομάδα των προκαρυωτικών οργανισμών. Η απουσία του ενζύμου σε αυτούς τους μικροοργανισμούς συνδέεται με την απουσία μηχανισμού σύνθεσης της γλουταθειόνης (Fahey 2001).

1.8.1. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Στις πρώτες μελέτες οι οποίες επικεντρώθηκαν στην αναζήτηση δραστηριότητας GST σε βακτήρια χρησιμοποιούνταν, κατά κύριο λόγο, ως υπόστρωμα το CDNB. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι GST δραστηριότητα στα βακτήρια είναι σπάνια ενώ τα επίπεδα της είναι σχετικά χαμηλά σε σύγκριση με αυτά που εμφανίζουν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (Fahey & Sundquist 1991, Penninckx & Elskens 1993, Sheehan and Casey 1993). Η ανακάλυψη, όμως, της απαλογονάσης του διγλωρομεθανίου (DCMD) και GST ενζύμων σε μεθυλοτροφικά βακτήρια (Kohler-Staub & Leisinger 1985, Leisinger et al. 1994, Scholtz et al. 1988) καθώς και ο καθαρισμός και λεπτομερής χαρακτηρισμός GST ενζύμων από τα βακτήρια *P. mirabilis* (Di Pilio et al. 1988) και *E. coli* B (Iizuka et al. 1989) άλλαξαν τα μέχρι τότε δεδομένα.

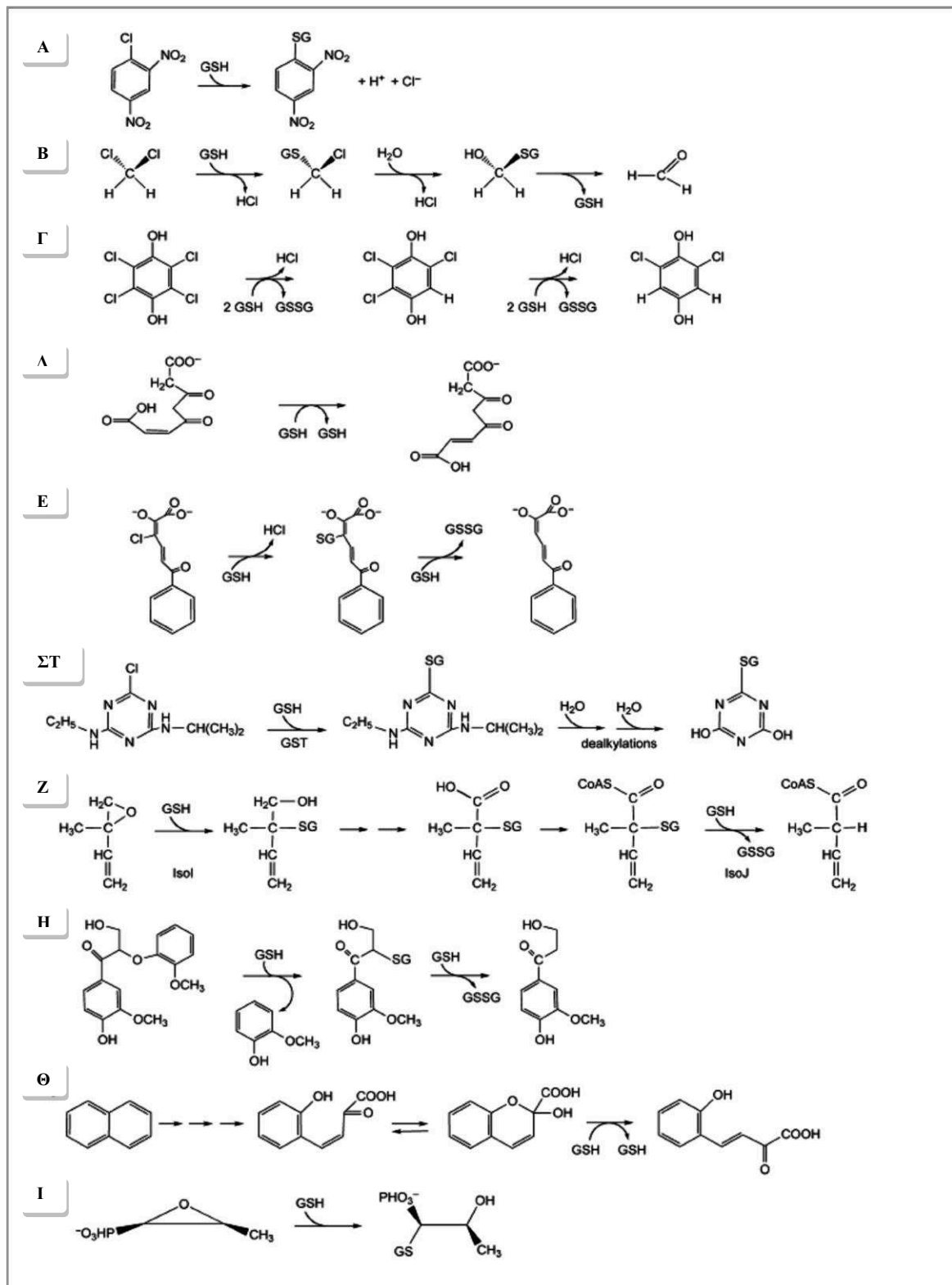
Διαπιστώθηκε ότι ένζυμα που απομονώνονται από βακτηριακά στελέχη δεν εμφανίζουν δραστηριότητα μόνο με το CDNB αλλά και με τυπικά υποστρώματα των ευκαρυωτικών GST (Σχήμα1.18). Για παράδειγμα μεγάλος αριθμός GST ενζύμων από όλες τις τάξεις φαίνεται να παρουσιάζουν δραστηριότητα ως προς διάφορα εποξειδία (Di Ilio et al. 1988, Mannervik & Danielson 1988, Nishida et al. 1994). Η πρόσφατη ανακάλυψη της πρωτεΐνης YghU από το *Escherichia coli* αποκάλυψε μικρή έως ανύπαρκτη δραστηριότητα GST έναντι των περισσότερων τυπικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων και μία σημαντική καταλυτική δράση έναντι διαφόρων οργανικών υδρουπεροξειδίων (Stourman et al. 2011). Παρόλ' αυτά, το CDNB αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για τον προσδιορισμό της ενζυμικής GST δραστηριότητας, επειδή επιτρέπει την εύκολη φασματοφωτομετρική ανίχνευση του συζευγμένου με τη γλουταθειόνη προϊόντος. Οι βακτηριακές GSTs, ωστόσο, φαίνεται ότι δεν αποτελούν ποσοτικά κυρίαρχες πρωτεΐνες στο κύτταρο (0.002 έως 0.1%) αν κρίνουμε από τους συντελεστές καθαρισμού μέσω χρωματογραφίας συγγένειας (Iizuka et al. 1989, Nishida et al. 1994, Piccolomini et al. 1989). Παρόλ'αυτα, η παρουσία των συγκεκριμένων ενζύμων σχετίζεται με την αυξημένη ανοχή των βακτηρίων σε πολλά αντιβιοτικά (Perito et al. 1996, Piccolomini et al. 1989), ενώ μερικά ένζυμα φαίνεται να εμφανίζουν και δράση αλκυλοπεροξειδάσης (Nishida et al. 1994, Piccolomini et al. 1989).

Οι μικροβιακές GSTs δρουν και ως απαλογονάσες καθώς διαδραματίζουν ένα ρόλο-κλειδί στη βιοαποικοδόμηση διάφορων χλωριωμένων, αλειφατικών και αρωματικών ξενοβιοτικών ενώσεων (Vuilleumier & Leisinger 1996, Wang et al. 1996) (Σχήμα1.18). Αλογονομένες ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία και αποτελούν μία σημαντική και επικίνδυνη ομάδα περιβαλλοντικών ρύπων. Οι βακτηριακές GSTs, χρησιμοποιώντας γλουταθειόνη ως συμπάραγοντα, καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις απαλογόνωσης όπως την υδρολυτική απαλογόνωση του διχλωρομεθανίου σε φορμαλδεΰδη. Η συγκεκριμένη αντίδραση επιτρέπει σε μεθυλοτροφικά βακτήρια να αναπτύσσονται πάνω στο DCM χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Leisinger et al. 1994). Η γλουταθειόνη στην περίπτωση αυτή δρα ως συμπάραγοντας στην καταλυτική αντίδραση και αναγεννάται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής διαδικασίας. Γονίδια GST που εντοπίστηκαν σε βακτηριακά στελέχη φαίνεται να εμπλέκονται και στον μεταβολισμό αρωματικών ενώσεων όπως αυτά που εντοπίστηκαν στο βακτήριο *Burkholderia* strain LB400 που συμμετέχει στην αποικοδόμηση διφαινυλίων (Seeger 1999) και στο *Cycloclasticus oligotrophus* RB1, ένα θαλάσσιο μεθυλοτροφικό βακτήριο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Wang et al. 1996) (Σχήμα1.18).

Άλλες βακτηριακές GST χρησιμοποιούν την GSH ως αναγωγικό παράγοντα κατά την καταλυτική διαδικασία οξειδώνοντας την ανηγμένη γλουταθειόνη σε δισουλφίδιο του γλουταθει-

ου. Η αναγωγική απαλογόνωση της 2,3,5,6-τετραχλωρο-*p*-υδροξικινόνης σε πενταχλωροφαινόλη από το *Sphingomonas chlorophenolica* (Nohynek et al. 1996 formerly identified as a *Flavobacterium* strain) που καταλύεται από το ένζυμο PcpC (Tetrachloro-*p*-hydroquinone Dehydrogenase) φαίνεται να εξαρτάται από την γλουταθειόνη που δρα ως αναγωγικός παράγοντας (Xun et al. 1992).

Η αναγωγική διάσπαση των αιθερικών δακτυλίων (Σχήμα1.18) στους αρυλ-γλυκερολ-β-αρυλαιθέρες, που συναντώνται κυρίως στη λιγνίνη, καταλύεται από το ένζυμο β-αιθεράση που κωδικοποιείται από δυο γονίδια, τα *ligF* και *ligE*, τα οποία κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν από το *Pseudomonas raucimobilis* SYK-6 (Masai et al. 1993). Το *LigF* θεωρείται ότι είναι η μοναδική βακτηριακή GST που ανήκει στην οικογένεια των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Masai et al. 1993).



ΣΧΗΜΑ 1.18. Αντιδράσεις που καταλύονται από τις βακτηριακές GSTs. (A) Σύζευξη του CDNB ως δεύτερο υπόστρωμα (B) απαλογόνωση του DCM σε φορμαλδεΐδη (Γ) αναγωγική απαλογόνωση του TCHQ σε τριχλωρουδροκινόνη και της τριχλωρουδροκινόνης σε 2,6-διχλωρουδροκινόνη (Δ) *cis-trans* ισομερείωση του μαλειλακετοοξικού οξέος (E) απαλογόνωση

του 3-χλωρο-HOPDA (2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-2,4-hexadienoic acid) (ΣΤ) υποθετική μεταβολική οδός της ατραζίνης (Ζ) διάνοιξη του εποξειδικού δακτυλίου και αναγωγική απομάκρυνση της GSH στον μεταβολισμό του ισοπρενίου (Η) σπάσιμο του β-αρυλ-αιθέρα (Θ) τέταρτο στάδιο στο καταβολικό μονοπάτι του ναφθαλενίου (Ι) διάνοιξη του εποξειδικού δακτυλίου της φωσφομυκίνης.

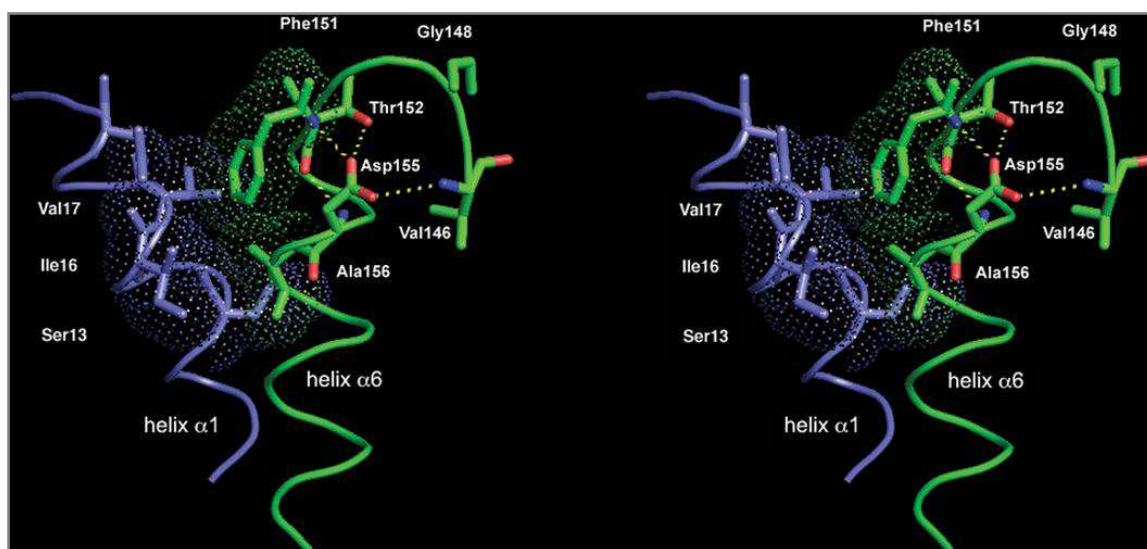
1.8.2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ GST

Οι περισσότερες από τις βακτηριακές GSTs ανήκουν στην β τάξη η οποία είναι αποκλειστικά βακτηριακή ενώ από το 1998 έχουν προσδιοριστεί οι κρυσταλλικές δομές τεσσάρων αντιπροσώπων της: *P. mirabilis* GST (*PmGST*) (Rossjohn et al. 1998), *E. coli* GST (*EcGST*) (Nishida et al. 1998), *B. xenovorans BphK* (*BxGST*) (Tocheva et al. 2006) και *O. anthropi* GST (*OaGST*) (Federici et al. 2007). Οι πληροφορίες για τις πρωτεϊνικές δομές των βακτηριακών GST σε συνδυασμό με τη χρήση τεχνικών κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, έχουν επιτρέψει την αναλυτική διερεύνηση των δομικών και καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων της β τάξης.

Οι β τάξης GSTs είναι ομοδιμερή με μήκος αλυσίδας 201–203 αμινοξικών καταλοίπων. Η τεταρτοταγή δομή της N-τελικής δομικής ενότητας υιοθετεί μια χαρακτηριστική “GST αναδίπλωση” ίδια με αυτήν της θειορεδοξίνης (Katti et al., 1990, Martin, 1995, Wilce & Parker, 1994) και ακολουθείται από μια C-τελική περιοχή αποτελούμενη από έλικες η οποία συνδέεται με τη N-τελική περιοχή με ένα μικρού μήκους σύνδεσμο. Συγκρίνοντας τις κρυσταλλικές δομές ενζύμων GST, συμπεραίνουμε ότι η συνολική αναδίπλωση στις πρωτεΐνες της β τάξης είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η κανονική αναδίπλωση των GSTs φαίνεται ουσιαστικά να διατηρείται από τα βακτήρια στα θηλαστικά. Ο προσανατολισμός των μονομερών μεταξύ των διαφορετικών διμερών είναι επίσης αξιοσημείωτα συντηρημένος (Federici et al. 2007).

Παρά το γεγονός ότι η αναδίπλωση του μονομερούς στις GSTs της β τάξης είναι παρόμοια με εκείνη των άλλων cGSTs, η κοινή επιφάνεια μεταξύ των μονομερών παρουσιάζει διαφορές. Σε αντίθεση με τις GSTs των άλλων τάξεων, δεν παρατηρείται καμία ανοιχτή επιφάνεια σχήματος V μεταξύ των μονομερών (Rossjohn et al. 1998), ενώ ο υδρόφοβος χαρακτήρας της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των μονομερών που παρατηρείται στην πλειοψηφία των τάξεων, δεν παρατηρείται στις GSTs της β τάξης όπου έχει χαρακτήρα πολικό. Ως συνέπεια των παραπάνω, το χαρακτηριστικό μοτίβο κλειδαριάς-κλειδιού που συναντάται στις GST της α, π και μ τάξης αποτελούμενο από ένα προεξέχον αρωματικό κατάλοιπο του ενός μονομερούς το

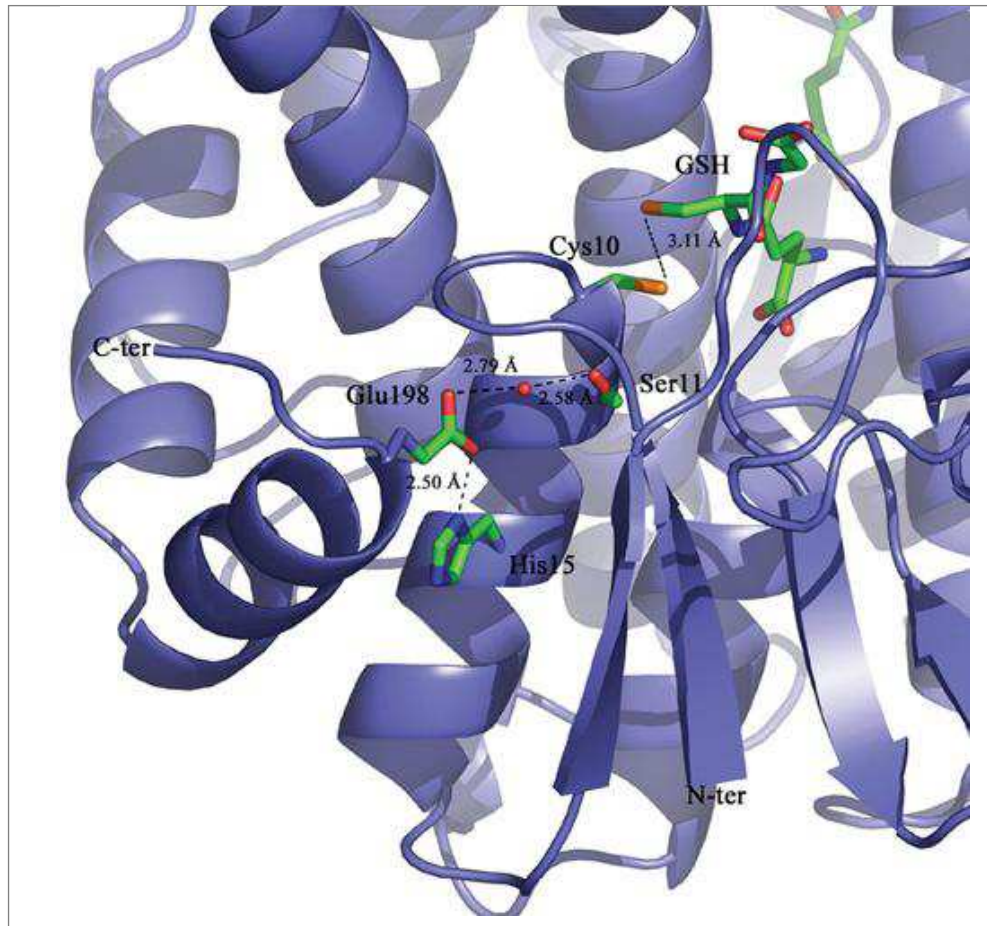
οποίο «κλειδώνει» σε μια υδρόφοβη «κλειδαριά» του έτερου μονομερούς, απουσιάζει στις GSTs της β τάξης (Rossjohn et al. 1998, Federici et al. 2007). Υπάρχουν, όμως, αλλά δομικά μοτίβα που είναι χαρακτηριστικά για τις GSTs από θηλαστικά τα οποία εμφανίζονται και στις GSTs της β τάξης, αποκαλύπτοντας την αρχαία κοινή προέλευση τους. Ανάμεσα σε αυτά, το “N-κουτί προσαρμογής” (N-capping box) και τα διαδοχικά υδρόφοβα μοτίβα στο N-άκρο της έκτης έλικας της καρβοξυ-τελικής περιοχής (Σχήμα 1.19) παίζουν ένα σημαντικό σταθεροποιητικό ρόλο ενώ συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με την αμινο-τελική περιοχή (Allocati et al. 2006).



ΣΧΗΜΑ 1.19. Η περιοχή με τα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν το μοτίβο “N-κουτί προσαρμογής” (N-capping box) στο ένζυμο PmGST B1-1 (Allocati et al. 2006). Η $\alpha 1$ -έλικα παρουσιάζεται με μπλε χρώμα και η $\alpha 6$ -έλικα με πράσινο χρώμα. Το μοτίβο (Ser/Thr-Xaa-Xaa-Asp) που ονομάζεται “capping box” (Baker & Hubbard 1984, Dasgupta & Bell, 1993, Harper & Rose 1993) εμφανίζεται στην αρχή της $\alpha 6$ -έλικας σε όλες τις γνωστές GSTs. Το συγκεκριμένο μοτίβο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της $\alpha 6$ έλικας και αποτελεί ένα αυστηρά συντηρημένο μοτίβο του υδρόφοβου πυρήνα των GSTs.

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ένα δομικό μοτίβο στα β τάξης ένζυμα που φαίνεται να συναντάται αποκλειστικά στη συγκεκριμένη τάξη. Το μοτίβο αυτό σχηματίζεται από ένα δίκτυο υδρογονικών δεσμών, το οποίο εντοπίζεται κοντά στη G θέση και λειτουργεί ως «φερμουάρ» ανάμεσα στην τελική έλικα της C-τελικής περιοχής και την αρχική έλικα της N-τελικής περιοχής (Σχήμα 1.20). Μάλιστα, μερική διατάραξη του συγκεκριμένου μοτίβου έδειξε να έχει

δραματικές συνέπειες τόσο στην σταθερότητα όσο και στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης *OaGST* (Federici et al. 2007).

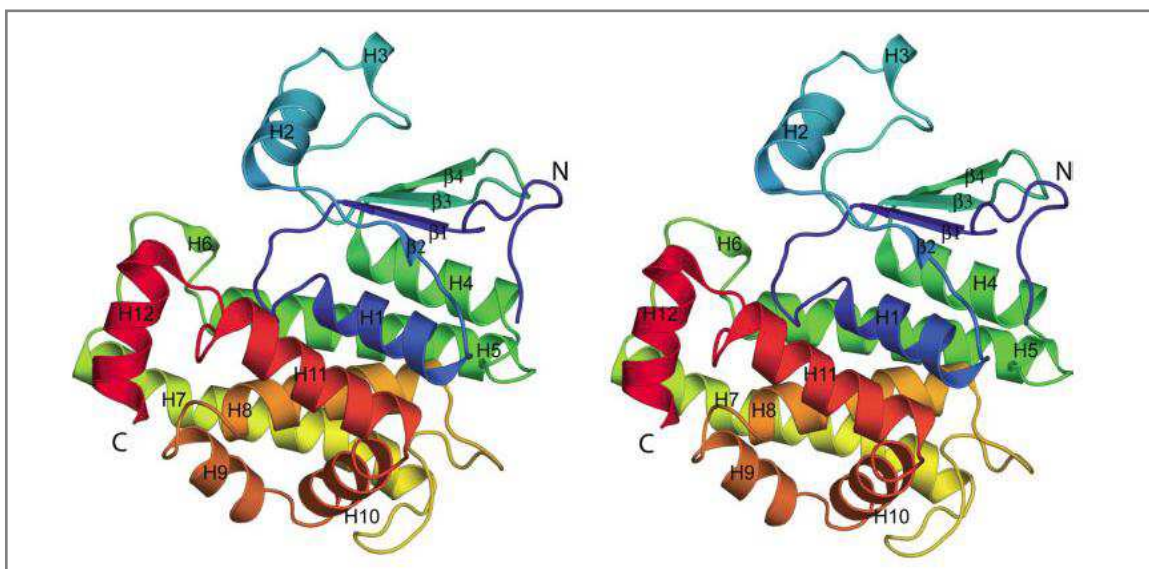


ΣΧΗΜΑ 1.20. Τα αμινοξικά κατάλοιπα και το δίκτυο υδρογονικών δεσμών κοντά στη G θέση δέσμευσης της γλουταθειόνης στο ένζυμο *OaGST* (Federici et al. 2007). Το συγκεκριμένο μοτίβο είναι συντηρημένο στην πλειοψηφία των βακτηριακών GSTs.

Η γλουταθειόνη δεσμεύεται στις GSTs της β τάξης με διάφορους τρόπους, γεγονός που συμφωνεί με αυτό που παρατηρείται και στα ένζυμα των υπόλοιπων τάξεων. Διάφορες αλληλεπιδράσεις, πολικές και υδροφοβικές, συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση της συμπεριλαμβανόμενου ενός υδρογονικού δεσμού με ένα ασπαρτικό αμινοξικό κατάλοιπο του άλλου μονομερούς (Rossjohn et al. 1998, Federici et al. 2007).

Το σύνολο των GST της β τάξης χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας συντηρημένης κυστεΐνης κοντά στη σουλφιδρυλομάδα της GSH. Ωστόσο, η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων θείου του δισουλφιδικού δεσμού ποικίλλει μεταξύ των βακτηριακών GSTs όπως αποκά-

λυσε η κρυσταλλική δομή τριών ενζύμων (*PmGST*, *OaGST*, *BxGST*) (Rossjohn et al. 1998, Federici et al. 2007, Tocheva et al. 2006). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι ένα αμινοξικό κατάλοιπο ιστιδίνης που βρίσκεται σε απόσταση σχηματισμού υδρογονικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της GSH φαίνεται να είναι συντηρημένο σε πολλές GSTs της β τάξης σε αντίθεση με ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης που επίσης βρίσκεται σε απόσταση σχηματισμού υδρογονικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της GSH αλλά δεν είναι συντηρημένο (Nishida et al. 1998, Federici et al. 2007, Tocheva et al. 2006). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μεταλλάξεις στις δυο βακτηριακές GSTs *PmGST* and *EcGST* έδειξαν ότι κανένα από το προαναφερόμενα αμινοξικά κατάλοιπα (Ser9, Cys10 and His106) δεν απαιτούνται προκειμένου να ενεργοποιηθεί η GSH προς σύζευξη υποστρωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι, σε αντίθεση με GSTs από θηλαστικά, η σταθεροποίηση του GS⁻ ανιόντος είναι πιθανόν αποτέλεσμα ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων (Casalone et al. 1998, Allocati et al. 2000, Inoue et al. 2000). Δυο άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες εμφανίζουν σημαντική αμινοξική ομοιότητα με τις μιτοχονδριακές GSTs της κ τάξης, η DsbA και η ισομεράση HCCA. Το ένζυμο HCCA υιοθετεί την ίδια τοπολογία με τις GSTs της κ τάξης με ελάχιστες διαφορές που αφορούν τον τρόπο δέσμευσης της GSH (Thompson et al. 2007), ενώ η πρωτεΐνη DsbA αποτελεί δομικό και όχι λειτουργικό ομόλογο των ενζύμων της κ τάξης αφού το ενεργό κέντρο της δεν δεσμεύει τη GSH και λόγω του μοτίβου του έχει τη δυνατότητα να εκτελεί οξειδοαναγωγικές καταλύσεις (Martin et al. 1993).



ΣΧΗΜΑ 1.21. Πρωτεϊνική δομή της πρωτεΐνης *a1GST1*: παρουσιάζονται τα μονομερή της πρωτεΐνης *a1GST1* όπου διακρίνονται το N-τελικό άκρο (μπλε) και το C-τελικό άκρο (κόκκινο). Οι έλικες (H1–H12) και οι β-στροφές (b1–b4) είναι αριθμημένες (Kossloff et al. 2006).

Η δομική γονιδιωματική αποτελεί αρωγό στην κατανόηση της εξέλιξης της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και του λειτουργικού προφίλ των πρωτεϊνών, των οποίων ο ρόλος προέκυψε στο παρελθόν από υποθέσεις βασισμένες μόνο στην ευθυγράμμιση των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Χαρακτηριστική περίπτωση ενός τέτοιου παραδείγματος αποτελεί το γονίδιο *Atu5508* του βακτηριακού στελέχους *Ag. Tumefaciens* του οποίου η δομή προσδιορίστηκε πρόσφατα (Kosloff et al. 2006). Η πρωτεΐνη είναι διμερής (Σχήμα 1.21), δεσμεύει τη GSH και υιοθετεί μια κανονική GST αναδίπλωση παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας <20% σε σύγκριση με τις αμινοξικές αλληλουχίες ήδη χαρακτηρισμένων cGSTs. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι μια λειτουργική GST αφού καταλύει την αντίδραση σύζευξης της GSH με το π -βενζυλοχλωρίδιο, που αποτελεί υπόστρωμα των GST. Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης και η δομική της ανάλυση υποδεικνύουν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο σχετίζεται περισσότερο με τις GSTs από θηλαστικά παρά με τις βακτηριακές GSTs. Συγκεκριμένα, στερείται τα δομικά χαρακτηριστικά των GSTs της β τάξης συμπεριλαμβανομένης της απουσίας των καταλυτικών αμινοξέων κυστεΐνης και ιστιδίνης στη G θέση και της παρουσίας του υδρόφοβου μοτίβου κλειδαριάς-κλειδιού στην κοινή επιφάνεια επαφής μεταξύ των μονομερών. Για τους λόγους αυτούς προτάθηκε η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ως πρότυπο μιας νέας τάξης βακτηριακών GSTs η οποία περιλαμβάνει διάφορες ομόλογες πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν αναλύοντας μια μεγάλη σειρά περιβαλλοντικών δειγμάτων (Kosloff et al. 2006).

1.9. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GSTS

1.9.1. ΙΑΤΡΙΚΗ

Τα ένζυμα GSTs είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών με λειτουργική ποικιλότητα που καλύπτει διαδικασίες από την αποτοξίνωση μέχρι τη βιοσύνθεση. Κύριος ρόλος των ενζύμων αποτελεί η κατάλυση της σύζευξης μη πολικών ενώσεων που περιέχουν ένα ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα, αζώτου ή θείου με τη GSH, συμβάλλοντας στο μεταβολισμό φαρμάκων, παρασιτοκτόνων και άλλων ξеноβιοτικών ουσιών. Η καταλυτική και δομική ποικιλότητα των GSTs αποτελούν τη βάση για την αποτελεσματική αξιοποίηση και εφαρμογή των ενζύμων. Τα τελευταία χρόνια, σημαντικές πρόοδοι έχουν γίνει για την κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των GSTs. Καθώς η έρευνα που αφορά τις ιδιότητες νέων ισοενζύμων στα φυτά, τα θηλαστικά ή τα μικρόβια συνεχίζεται, οι τομείς της γονιδιωματικής και πρωτεωμικής θα παρέχουν περισσότερες γνώσεις και πληροφορίες για την παρουσία και δραστηριότητα των GSTs στο κύτταρο.

Οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζύμων GSTs καλύπτουν σήμερα ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών κλάδων. Στην ιατρική οι GSTs μελετώνται στον τομέα της διάγνωσης και παρα-

κολούθησης κλινικών περιπτώσεων καρκίνου. Ορισμένα ένζυμα GST χρησιμοποιούνται ως ανοσοιστολογικοί δείκτες για πολλούς τύπους καρκίνου καθώς αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών συνδέονται με τη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου και τον εντοπισμό προκαρκινικών κυτταρικών βλαβών (Habdous et al. 2002). Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες διερευνούν τη σχέση μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών των GST και συγκεκριμένων ασθενειών όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Covolo et al. 2008). Βρέθηκε μάλιστα ότι πολυμορφισμοί σε ανθρώπινα GST γονίδια συνδέονται με τον τρόπο αντίδρασης του οργανισμού στην θεραπεία κατά του καρκίνου (Oldenburg et al. 2007, Sweeney et al. 2003, Stoehlmacher et al. 2002, Nunes et al. 2009, Keller, et al. 2006, Yoshiga & Soya 2005, Keller, et al. 2002)

Οι παραλλαγές αυτές των τρανσφερασών του γλουταθείου θα βοηθήσουν στο μέλλον για την επιλογή της καλύτερης εξατομικευμένης θεραπείας για διάφορους τύπους καρκίνου (Oldenburg et al. 2007, Sweeney et al. 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αλλοένζυμο GSTP1 105Val το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής ασθενών σε προχωρημένα στάδια καρκίνου του παχέος εντέρου που λάμβαναν συνδυασμένη χημειοθεραπεία (Stoehlmacher et al. 2002). Τα ένζυμα GSTs δεν σχετίζονται μόνο με τον καρκίνο. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ισοένζυμων της π και α τάξης φαίνεται να συνδέονται επίσης με ασθένειες στο συκώτι και τους νεφρούς (Sundberg et al. 1994). Σε μία άλλη έρευνα, οι Güven et al. (2011) μελέτησαν την επίδραση των γενετικών πολυμορφισμών των GSTs *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* στις εκφυλιστικές αλλαγές στην ωχρά κηλίδα του οφθαλμού που οδηγούν σε απώλεια της κεντρικής όρασης. GSTs που απομονώθηκαν από μεταξοσκώληκα, εμφάνισαν προστατευτική δράση προλαμβάνοντας την υπατοτοξικότητα σε ποντίκια που τους χορηγήθηκε τετραχλωράνθρακας (Yan et al. 2011).

Οι ω τάξης GSTs (GSTO) εμφανίζουν ένα μοναδικό εύρος ενζυμικών ιδιοτήτων σε σύγκριση με άλλες GSTs. Το ισοένζυμο GSTO1-1 δρα ως ρεδοκτάση του διυδροασκορβικού οξέος και θειολτρανσφεράση ενώ καταλύει επίσης και την αναγωγή ενός ενδιάμεσου προϊόντος, του μονομεθυλαρσενικού οξέος, στο μεταβολικό μονοπάτι βιομετατροπής του αρσενικού οξέος (Board et al. 2000, Li et al. 2006). Ανάμεσα στις λειτουργίες της πρωτεΐνης GSTO1-1 συμπεριλαμβάνεται η αλληλεπίδραση της με ουσίες αναστολείς της κυτοκινίνης ενώ επίσης δρα ενεργοποιώντας τους υποδοχείς της ρυανοδίνης. Επιπλέον, η δράση της GSTO1 έχει συνδεθεί με την ηλικία εμφάνισης των ασθενειών του Αλτσχάιμερ και του Πάρκινσον (Li et al. 2006). Στην περίπτωση αυτή, ο ρόλος του ενζύμου στη μείωση του διυδροασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο μπορεί να σχετίζεται με την ηλικία εμφάνισης των δυο ασθενειών (Li et al. 2006, Allen et al. 2003).

1.9.2. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.9.2.1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΛΟΜΗΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΡΥΠΩΝ

Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των GSTs στον τομέα της περιβαλλοντικής εξυγίανσης, καθώς έχουν την ικανότητα βιοαποικοδόμησης τοξικών περιβαλλοντικών ρύπων συμπεριλαμβανομένων επικίνδυνων ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων (Roberts et al., 2001) και βαρέων μετάλλων (Cursino et al., 2000). Αξίζει να τονισθεί ότι η συμβολή των μεθόδων της πρωτεϊνικής μηχανικής και του ανασυνδυασμένου DNA θεωρείται πολύ σημαντική για τη δημιουργία βελτιωμένων μορφών ενζύμων GSTs με αυξημένη καταλυτική και αποτοξινωτική δράση έναντι τοξικών επιβλαβών ενώσεων. Τα μεταλλαγμένα αυτά ένζυμα προκύπτουν από τροποποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων μέσω σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλάξευσης οπότε δημιουργούνται σημειακές μεταλλαγές σε αμινοξικά κατάλοιπα της ενεργής περιοχής του ενζύμου (Κλώνης, 2007). Η επιλογή των αμινοξικών καταλοίπων που τροποποιούνται βασίζεται σε πληροφορίες που αντλούνται από την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, καθώς και το αμινοξικό και λειτουργικό της προφίλ (ορθολογικός σχεδιασμός). Υιοθετώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο, η σημειακή μετάλλαξη Ile118Phe στο ένζυμο *ZmGSTF1* οδήγησε σε τετραπλάσια δραστικότητα έναντι του ζιζανιοκτόνου Alachlor (Labrou et al., 2004; Labrou et al., 2005). Οι Dixon et al., (2003) δημιούργησαν ένα γονίδιο *gst* με αυξημένη καταλυτική δράση κατά 29 φορές έναντι του ζιζανιοκτόνου fluorodifen. Τα διαγονιδιακά φυτά της *A. thaliana* που έφεραν το γονίδιο αυτό, επέδειξαν υψηλότερη ανοχή έναντι του fluorodifen, με αποτέλεσμα η αύξησή τους να μην επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την τοξική του δράση (Basantani and Srivastana, 2007).

Η απομάκρυνση των ανθρωπογενών, οργανικών ρύπων από το περιβάλλον θεωρείται ως ένα από τα βασικά θέματα για τη βιώσιμη ανάπτυξη του πλανήτη τον 21ο αιώνα. Στα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της βιοεξυγίανσης περιλαμβάνονται η αποτελεσματική επί τόπου αποδόμηση τοξικών ουσιών με χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές φυσικοχημικές μεθόδους απορρύπανσης. Επιπλέον, η τεχνική της βιοεξυγίανσης αποτελεί μια μέθοδο ελάχιστης διαταραχής του μολυσμένου περιβαλλοντικού μέσου κατά την εφαρμογή της για αυτό και κατατάσσεται στις ήπιες τεχνολογίες (soft technologies) (Paul et al. 2005, Sutherland et al. 2004). Το βιοτεχνολογικό αυτό εργαλείο, χρησιμοποιεί ολόκληρους μικροοργανισμούς, που είτε φυσικά υπάρχουν είτε εισάγονται στο περιβάλλον, ή απομονωμένα ένζυμα με σκοπό την αποικοδόμηση επίμονων ρυπαντών και τη μετατροπή τους σε μη ή λιγότερο τοξικές ενώσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, η βιοαποκατάσταση μπορεί να συνδυαστεί με συμπληρωματικές φυσικές, χημικές ή μηχανικές διαδικασίες προκειμένου να βελτιωθεί η αξιο-

πιστία και η αποτελεσματικότητα της αποτοξίνωσης. Η μικροβιακή βιοεξυγίανση η οποία χρησιμοποιεί φυσικά μικρόβια σε συνδυασμό με μηχανικές προσεγγίσεις αποτελεί σήμερα τον κύριο μηχανισμό για την απομάκρυνση χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Στην πραγματικότητα, σε αυτόν τον τομέα της βιοτεχνολογίας, χρησιμοποιούνται και πολλές άλλες εναλλακτικές μέθοδοι όπως είναι η εφαρμογή της *in situ* βιοδιέγερσης (βιοεξαερισμός (bioventing), της φυσικής εξασθένησης (natural attenuation) (El Fantroussi & Agathos 2005, Thompson et al. 2005) ή των *ex situ* τεχνολογιών (π.χ. βιοκύτταρα, τεχνική landfarming) (Labrou et al. 2004).

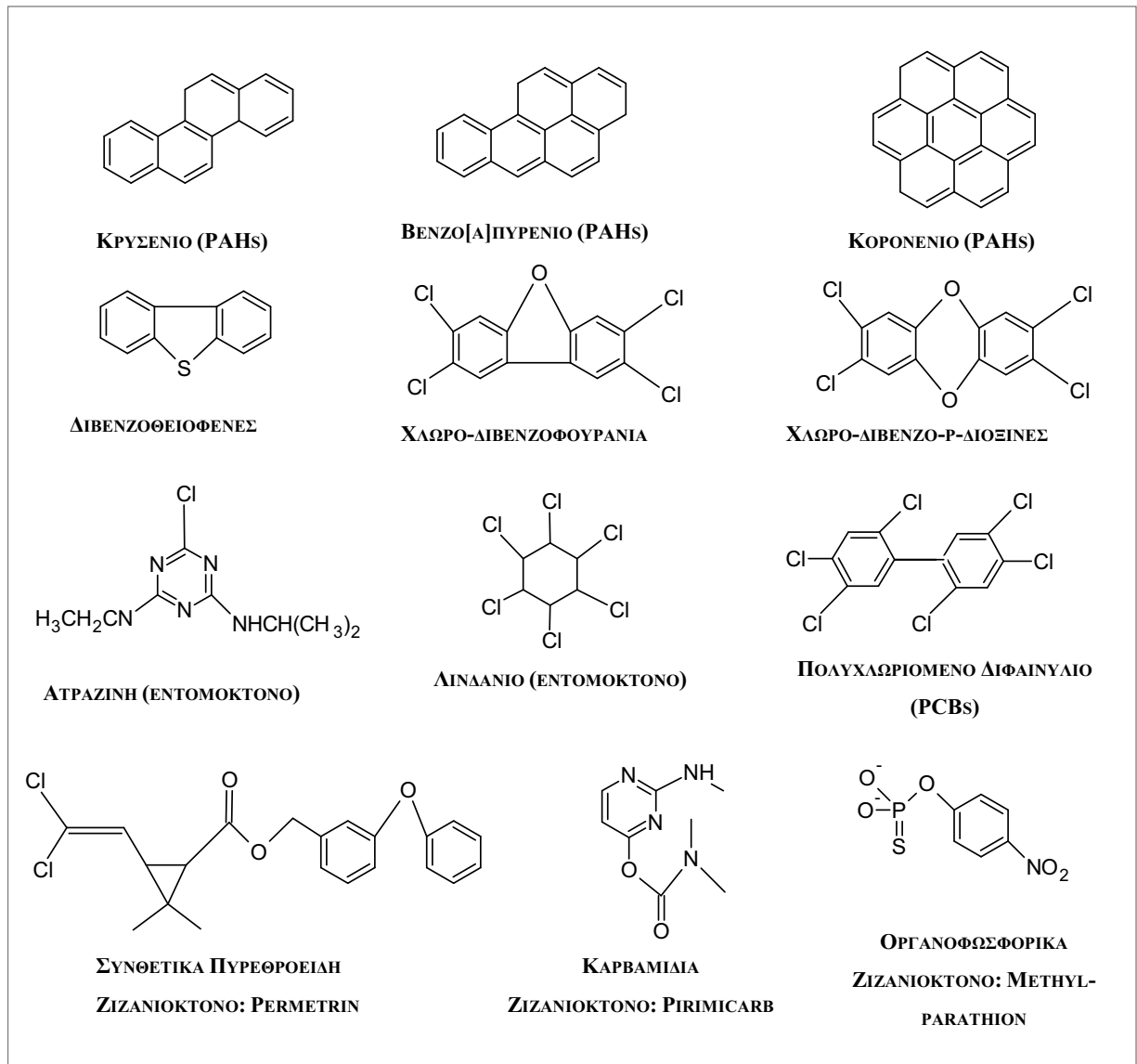
1.9.2.2. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, η ενζυμική βιοαποκατάσταση αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο αφού τα ένζυμα παρέχουν πιο απλά συστήματα από έναν ολόκληρο οργανισμό (Sutherland et al. 2004, Pieper et al. 2004). Η ενζυμική βιοαποκατάσταση ενδείκνυται για τις περισσότερες ξеноβιοτικές ενώσεις όπως για παράδειγμα, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) (Samanta 2002), τις πολυνιτρικές αρωματικές ενώσεις (Ramos et al. 2005), τα φυτοφάρμακα, τα χλωριωμένα βιομηχανικά απόβλητα, τις συνθετικές χρωστικές, τα πολυμερή και τα συντηρητικά ξύλου (κρεόσωτο, πενταχλωροφαινόλη) (Bajrai 2004) (Σχήμα 1.22). Επομένως, βασικό θέμα αποτελεί η αναζήτηση μικροοργανισμών που μπορούν να τρέφονται με ένα συγκεκριμένο ρύπο και στη συνέχεια η προσπάθεια για τον προσδιορισμό του ενζύμου (-ων) τα οποία είναι υπεύθυνα.

Ιστορικά, τα πιο μελετημένα ένζυμα στον τομέα της βιοαποκατάστασης είναι οι βακτηριακές μονο-ή δι-οξυγενάσες, οι ρεδοκτάσες, οι απαλογονάσες, ορισμένες τρανσφεράσες, οι μονο-οξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, ένζυμα από μύκητες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της λιγνίνης (λακάσες, υπεροξειδάσες της λιγνίνης και του μαγγανίου) και οι βακτηριακές φωσφοτριεστεράσες (Pieper et al. 2004).

Πρόσφατα προέκυψαν νέες εξελίξεις στον σχεδιασμό και την εφαρμογή ενζυμικών «κοκτέιλ» για την βιοεπεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Από περιβαλλοντική άποψη, η χρήση των ενζύμων, αντί χημικών ουσιών ή μικροοργανισμών αναμφίβολα παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα (Ahuja et al. 2004). Αρχικά, η βιομετατροπή των ρυπογόνων ενώσεων δεν παράγει τοξικά παραπροϊόντα όπως συμβαίνει συχνά με τις χημικές και ορισμένες μικροβιακές διαδικασίες, καθώς τα ένζυμα πέπτονται, *in situ*, από τους γηγενείς μικροοργανισμούς. Επίσης ενισχύεται η δυνατότητα να παράγονται ένζυμα σε μεγαλύτερη κλίμακα, με αυξημένη σταθερότητα ή/και δραστηριότητα και χαμηλότερο κόστος χρησιμοποιώντας την τεχνολογία

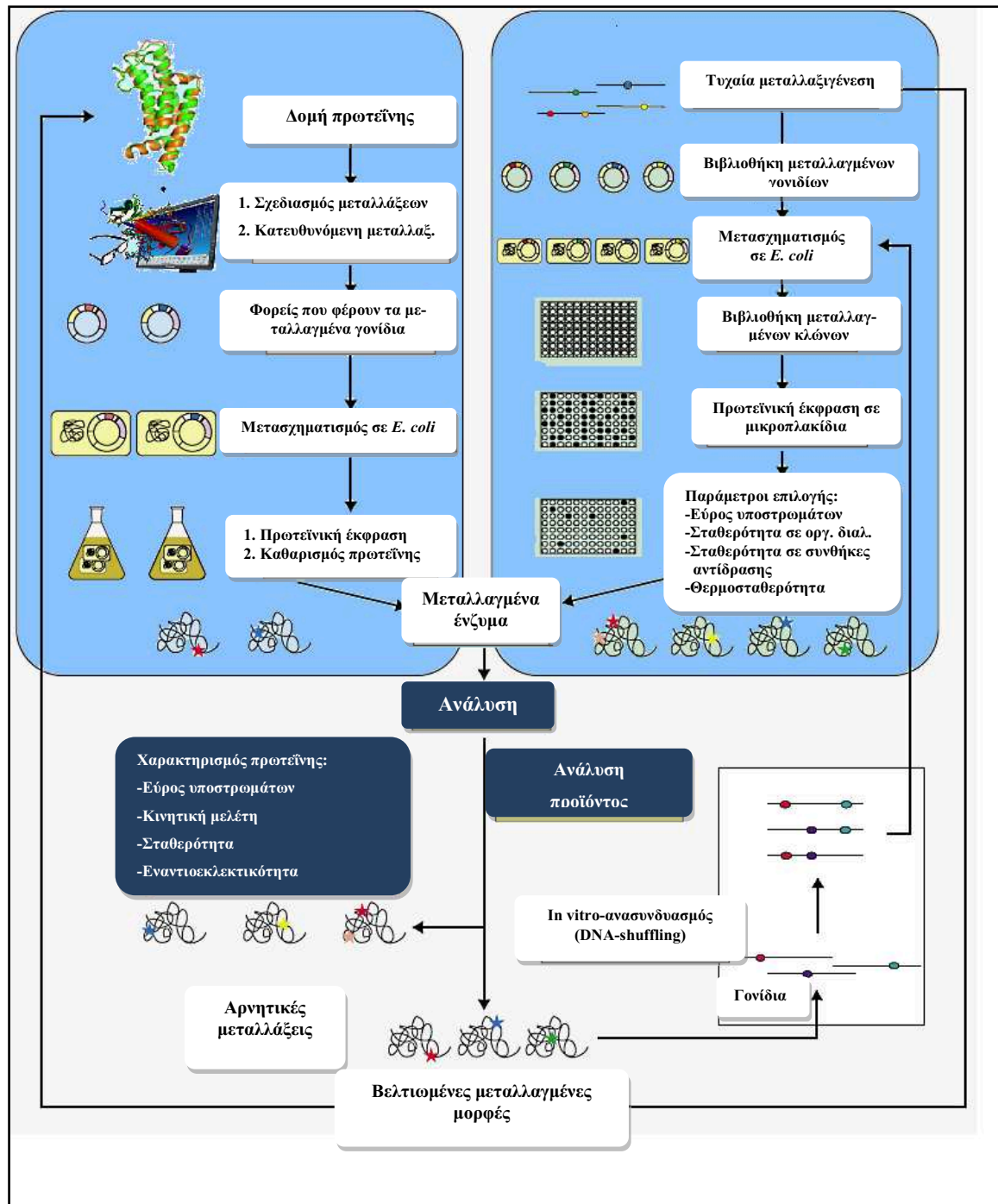
του ανασυνδρασμένου DNA. Τέλος σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η ευκολία και ευελιξία στη χρήση ενζύμων σε σύγκριση με τη χρήση ολόκληρων βακτηρίων.



ΣΧΗΜΑ 1.22. Παραδείγματα ξηνοβιοτικών ενώσεων οι οποίες αποτελούν επικίνδυνους τοξικούς περιβαλλοντικούς ρύπους.

Κατά την ενζυμική βιοαποκατάσταση, θεωρείται επιτακτική η ανάγκη να διατηρούνται οι βέλτιστες συνθήκες για το ένζυμο καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αυτό απαιτεί φθηνά παραγόμενα ένζυμα (ετερόλογης έκφρασης), με υψηλή συγγένεια ως προς το υπόστρωμα (της τάξεως των μM), τα οποία υποστηρίζουν χιλιάδες κύκλους διεργασιών. Την ίδια στιγμή, τα ένζυμα θα πρέπει να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε μια σειρά εξωτερικών παραγόντων και χαμηλή εξάρτηση από ακριβούς οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (όπως το

NAD(P)H), που θα μπορούσαν να αποδειχθούν απαγορευτικοί (Sutherland et al. 2004). Προφανώς, μια ιδανική μέθοδος βιοαποκατάστασης θα απαιτούσε την ταυτόχρονη βελτίωση πολλών ταυτόχρονα ενζυμικών ιδιοτήτων, όπως η ταυτόχρονη βελτίωση της σταθερότητας και δραστηκότητας του ενζύμου.



ΣΧΗΜΑ 1.23. Σύγκριση του ορθολογικού σχεδιασμού των πρωτεϊνών και της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Κατά τη διάρκεια του ορθολογικού σχεδιασμού πρωτεϊνών, οι μεταλλάξεις σχεδιάζονται με βάση

την πρωτεϊνική τους δομή και στη συνέχεια πραγματοποιούνται με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Μετά τον μετασχηματισμό τους σε έναν ξενιστή (π.χ. *E. coli*), η μεταλλαγμένη μορφή εκφράζεται, υπόκειται σε καθαρισμό και μελετάται για την εύρεση των επιθυμητών ιδιοτήτων. Η 'κατευθυνόμενη εξέλιξη' ξεκινά με την προετοιμασία βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων γονιδίων που προήλθαν από τυχαία μεταλλαξιγένεση, οι οποίες εκφράστηκαν στη συνέχεια σε έναν ξενιστή. Οι βιβλιοθήκες πρωτεϊνών συνήθως μελετώνται και ελέγχονται χρησιμοποιώντας μια σειρά από παραμέτρους επιλογής. Ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης και η ανάλυση του προϊόντος αποκαλύπτουν τις επιθυμητές και αρνητικές μεταλλαγμένες μορφές. Η μέθοδος του *in vitro* ανασυνδυασμού με DNA επανασύνδεση (DNA shuffling), για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω βελτιώσεις. Και οι δύο προσεγγίσεις πρωτεϊνικής μηχανικής μπορούν να επαναληφθούν ή να συνδυαστούν μέχρι να προκύψουν βιοκαταλυτές με τις επιθυμητές ιδιότητες.

Πολλά από αυτά τα θέματα έχουν λυθεί επιτυχώς χρησιμοποιώντας τεχνικές κατευθυνόμενης εξέλιξης του ενζύμου ή με ορθολογιστικές και ημι-ορθολογιστικές προσεγγίσεις (Arnold 2001, Tao and Cornish, 2002, Chica et al. 2005). Ο ορθολογικός σχεδιασμός αρχίζει από τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής (ή ενός ομόλογου μοντέλου), με τη βοήθεια της οποίας εντοπίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα-κλειδιά. Στη συνέχεια εισάγονται σε γονιδιακό επίπεδο και προκύπτει η μεταλλαγμένη μορφή στην οποία αναζητούνται οι επιθυμητές ιδιότητες (Σχήμα 1.23). Η κατευθυνόμενη εξέλιξη ξεκινά από ένα ή περισσότερα (ομόλογα) γονίδια, τα οποία υπόκεινται σε μια σειρά από μεθόδους τυχαίας μεταλλαξιγένεσης. Από τις προκύπτουσες βιβλιοθήκες μεταλλαγμένων κλώνων ή τις χίμαιρες που παράγονται, οι επιθυμητές μεταλλαγμένες μορφές πρέπει στη συνέχεια να χαρακτηριστούν χρησιμοποιώντας υψηλής απόδοσης screening ή μεθόδους επιλογής (Σχήμα 1.23). Με τη βοήθεια τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης, νέα βελτιωμένα χαρακτηριστικά μπορούν να αποδοθούν σε ένζυμα τα οποία δεν παρουσιάζουν συγγένεια έναντι καινούριων ή ελάχιστα οικοδομήσιμων ξενοβιοτικών (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, μυκοτοξίνες) (Raillard et al. 2001, Cho et al. 2002, Yang et al. 2003).

1.9.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η οικογένεια των φυτικών GSTs αποτελείται από οκτώ τάξεις (φ , τ , θ , ζ , λ , ρεδουκτάση του διυδροασκορβικού) και είναι ιδιαίτερα πολυπληθής (Edwards & Dixon 2005, McGonigle et al. 2000). Συνολικά 25 ένζυμα έχουν βρεθεί στη σόγια (*Glycine max*), 42 στο σιτάρι (*Zea mays*) 59 στο ρύζι (*Oryza sativa*), και 54 ισοένζυμα στο *Arabidopsis thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Ορισμένα μάλιστα από τα ένζυμα αυτά έχουν μελετηθεί εκτενώς, χαρακτηριστεί (McGonigle et al. 2000, Labrou et al. 2001, Labrou et al. 2001, Labrou et al.

2004, Thom et al. 2002) και κατοχυρωθεί (Mcgonigle & O'Keefe 2001, McGonigle & O'Keefe 2000, Cole et al. 2004).

Οι φυτικές GSTs έχουν αναλυτικά ερευνηθεί όσον αφορά κυρίως τη συμμετοχή τους στην αποτοξίνωση των φυτών από τα ζιζανιοκτόνα (τριαζίνες, θειοκαρβαμίδια, χλωροακετανιλίδια, διφαινυλαιθέρες και αρυλόξυ-φenoξυπροπιονικούς εστέρες) ενώ αρκετές GSTs φαίνεται να προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά έναντι των συγκεκριμένων τοξικών ενώσεων (Clarke et al. 1998, Schröder et al. 2001, Dixon et al. 2002, McGonigle et al. 2000, Thom et al. 2002). Η ικανότητα αυτή των φυτικών ειδών βασίζεται κυρίως στη διαφορετική ικανότητα τους να αποτοξινώνουν ένα ζιζανιοκτόνο, μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου ζιζανιοκτόνου-GSH. Οι φυτικές GSTs της φ και τ τάξης είναι πρωτίστως υπεύθυνες για τη διαδικασία της αποτοξίνωσης, γεγονός που αποκαλύπτει μια συσχέτιση μεταξύ της τάξης των ενζύμων και της εξειδίκευσης του υποστρώματος (Thom et al. 2002, Shimabukuro et al. 1971, Jepson et al. 1994). Για παράδειγμα, τα φ τάξης ένζυμα (GSTFs) εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα έναντι των θειοκαρβαμιδικών και χλωροακεταμιδικών ζιζανιοκτόνων (Edwards & Dixon 2000), ενώ της τα ένζυμα της τ τάξης (GSTUs) είναι αποτελεσματικά στην αποτοξίνωση των διφαινυλαιθέρων και αρυλόξυ-φenoξυπροπιονικών εστέρων (Thom et al. 2002, Jepson et al. 1994).

Η χρήση της γενετικής μηχανικής κατέστησε εφικτή την βελτίωση ορισμένων χαρακτηριστικών στα φυτά και τη μεταφορά ιδιοτήτων από το ένα φυτό στο άλλο. Οι GSTs, εξαιτίας της ικανότητας τους να αποτοξινώνουν ζιζανιοκτόνα και οργανικά υπεροξειδία θεωρούνται ένζυμα κατάλληλα για την ανάπτυξη διαγονιδιακών καλλιεργειών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα και τις καταπονήσεις. Η παγκόσμια βιβλιογραφία αναφέρεται στην παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών που υπερεκφράζουν ισoένζυμα GST (Cole et al. 2004, Dixon et al. 2003, Milligan et al. 2001, Roxas et al. 1997, Roxas et al. 2000, Karavangeli et al. 2005, Ginger et al. 2005, Yu et al. 2003, Drost et al. 2000, Danenberg 2006, Helmer et al. 1991, Takezawa, et al. 2001). Η υπερέκφραση των GSTs που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια αποτοξίνωσης τοξικών ενώσεων προσδίδουν σε πολλά διαγονιδιακά φυτά ανθεκτικότητα έναντι διάφορων ζιζανιοκτόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα διαγονιδιακά φυτά καπνού στα οποία εκφράζεται μία GST της φ τάξης από καλαμπόκι και τα οποία εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των χλωροακεταμιδίων και των θειοκαρβαμιδικών ζιζανιοκτόνων, ενώ αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των παραπάνω κατηγοριών ζιζανιοκτόνων αναφέρθηκε και σε διαγονιδιακά φυτά σιταριού (Milligan et al., 2001). Οι Gullner et al., (2001) αύξησαν την ανθεκτικότητα δέντρων λεύκης έναντι ορισμένων χλωροακεταμιδικών ζιζανιοκτόνων με υπερέκφραση του ενζύμου γ-γλουταμυλοκυστεΐνης το οποίο ευθύνεται για την αυξημένη παραγωγή GSH. Πιο πρόσφατα, διαγονιδιακά φυτά που συνθέτουν ομογλουταθειόνη (hGSH) σε αυξημένα επίπεδα στο κυτταρόπλασμα, εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι των ζιζανιοκτόνων

acifluorfen και fomesafen σε αντίθεση με τα φυτά άγριου τύπου όπου απουσιάζει η παραγωγή της hGSH (Sugiyama & Sekiya, 2005).

Οι Roxas et al. πέτυχαν αυξημένη βλάστηση και βελτιωμένη ανάπτυξη σπόρων κάτω από συνθήκες καταπόνησης με υπερέκφραση του ισοενζύμου *ZmGST27* από αραβόσιτο (Roxas et al. 1997, Roxas et al. 2000). Σε μία άλλη μελέτη, γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού που εκφράζουν ένα χμιαϊκό GST γονίδιο από αρουραίο (Helmer et al. 1991) και μία τροποποιημένη μορφή της *ZmGSTU1* από σιτάρι (Dixon et al. 2003) επέδειξαν αντίσταση σε ζιζανιοκτόνα που κανονικά δρουν ανασταλτικά σε μη τροποποιημένα φυτά. Πρόσφατα, οι Karavageli et al., δημιούργησαν γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού εκφράζοντας το γονίδιο GST I από σιτάρι (Karavangeli et al. 2005). Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά επέδειξαν φανερά υψηλότερη αντοχή στοalachlor σε σύγκριση με τα μη γενετικά τροποποιημένα φυτά.

Σε ένα άλλο παράδειγμα, γενετικά τροποποιημένα φυτά βαμβακιού (*Gossypium hirsutum L.*) που εκφράζουν το ισοένζυμο καπνού GST Nt107 αξιολογήθηκαν για την αντοχή που επιδεικνύουν στο ψύχος, την αλατότητα και τα ζιζανιοκτόνα. Εξετάστηκε επίσης και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ενζύμου (Ginger et al. 2005). Παρόλο που τα φυτά εμφάνισαν 5 και 10-φορές υψηλότερη δραστηριότητα υπό κανονικές συνθήκες και συνθήκες τοξικότητας, λόγω υψηλής αλατότητας, αντίστοιχα, δεν έδειξαν βελτιωμένη ανθεκτικότητα σε συνθήκες ψύχους και σε ζιζανιοκτόνα. Σε μία άλλη έρευνα, το γονίδιο GST (GST-CR1) από βαμβάκι, εισήχθη στο *Nicotiana tabacum* με μετασχηματισμό μέσω του *Agrobacterium tumefaciens* (Yu et al. 2003). Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη GST-CR1 είχαν φυσιολογική ανάπτυξη σε σύγκριση με τα control plants και παρουσίασαν πολύ υψηλότερα επίπεδα GST και GPx δραστηριότητας. Τα συγκεκριμένα, γενετικώς τροποποιημένα φυτά, παρουσίασαν μια βελτιωμένη αντοχή σε οξειδωτικές καταπονήσεις (methyl viologen). Οι Toshikazu et al. (2001), ανέφεραν ότι η έκφραση της GST Suaeda salsa στο διαγονιδιακό ρύζι (*Oryza sativa*) οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ανοχής στο στρες από αβιοτικούς παράγοντες (αλατότητα, ζιζανιοκτόνο N,N'-διμέθυλ-4,4'-διπυρινίδιο διχλωριδίου και ψύχος) (Takezawa et al. 2002). Σε ένα άλλο παράδειγμα, το γονίδιο *PjGST* από το φυτό *Prosopis juliflora* έχει μελετηθεί για την αντοχή που προσδίδει σε διαγονιδιακά φυτά ρυζιού και καπνού υπό συνθήκες αβιοτικού στρες (αλάτι και/ή συνθήκες υψηλής ξηρασίας) (Parida & George 2007).

1.9.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα των ενζυμικών βιοπροσδιορισμών και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων, καθώς αυξήθηκε σημαντικά η α-

νάγκη για φθινή, γρήγορη και εύκολη αξιολόγηση της σύνθεσης ενός δείγματος (Morou et al. 2008, Dowd et al. 2009). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να παρέχουν, σε πραγματικό χρόνο, ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες υψηλής ακρίβειας και εξειδίκευσης, με ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων και των δεδομένων, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, απομόνωσης και συμπύκνωσης οργανικών ενώσεων από περιβαλλοντικά δείγματα (wet chemistry). Επιπλέον είναι φιλικές προς το περιβάλλον και σαφώς ασφαλέστερες και ταχύτερες για τον χρήστη (Karoli et al. 2008) καθώς επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών δειγμάτων (Choi et al. 2003). Η ικανότητα των GSTs να καταλύουν τις αντιδράσεις σύζευξης με τη GSH έχει μελετηθεί με σκοπό τη δημιουργία τριών ενζυμικών βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων. Το ισοένζυμο GST I από σιτάρι χρησιμοποιήθηκε, με την ακινητοποιημένη μορφή του, για την ανάπτυξη ενός φορητού βιοαισθητήρα οπτικών ινών με σκοπό τον προσδιορισμό ενός κοινού ζιζανιοκτόνου, της ατραζίνης (Andreou & Clonis 2002). Σε ένα άλλο παράδειγμα, το ισοένζυμο *GmGSTU4-4* από σόγια, χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία βιοαισθητήρα με σκοπό τον προσδιορισμό του χλωροακεταμιδικού ζιζανιοκτόνου, alachlor (Fragoulaki et al. 2007). Ο προσδιορισμός βασίζεται στο γεγονός ότι το ένζυμο καταλύει τη σύζευξη της GSH με το alachlor με ταυτόχρονη απελευθέρωση πρωτονίων (HCl), η συγκέντρωση των οποίων είναι ανάλογη της ποσότητας του συζευγμένου ζιζανιοκτόνου. Πιο πρόσφατα, το ισοένζυμο GST *AaGSTE2-2* από το κουνούπι *Aedes aegypti* χρησιμοποιήθηκε για τον εξειδικευμένο προσδιορισμό του DDT [dichlorodiphenyl-trichloroethane 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] (Morou et al. 2008). Η αντίχνευση βασίστηκε στην αλλαγή του pH που λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση απομάκρυνσης δυο ομάδων HCl από το DDT, η οποία καταλύεται από το ένζυμο *AaGSTE2-2*.

Οι ενζυμικοί βιοπροσδιορισμοί βασίζονται στην αναστολή των ενζύμων από ξενοβιοτικές ενώσεις οι οποίες αναστέλλουν τον κύκλο ανανέωσης του υποστρώματος (turnover) και επιτρέπουν έμμεσα τον προσδιορισμό του ξενοβιοτικού (Karoli et al. 2008, Dowd et al. 2009, Enayati et al. 2001). Παρόλο που τα συγκεκριμένα συστήματα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, η εξειδίκευσή τους περιορίζεται λόγω της παρεμβολής ομόλογων ή άλλων μορίων που μπορούν επίσης να δρουν ως αναστολείς. Απαιτείται, επομένως, μεγάλη προσπάθεια για την ανακάλυψη ή προσαρμογή των ενζύμων ώστε να αναγνωρίζουν τα μόρια-στόχους των ξενοβιοτικών με υψηλή εξειδίκευση.

Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των ξενοβιοτικών ουσιών βασίζεται σε μετρήσεις ταχύτητας της αντίδρασης αναστολής χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές ή ποτενσιομετρικές μεθόδους αντίχνευσης ιόντων (Karoli et al. 2008, Dowd et al. 2009, Enayati et al. 2001). Ένζυμα GST χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού για την ποσοτικοποίηση των πυρεθροειδών εντομοκτόνων με τιτλοδότηση των

παραγόμενων ιόντων ιωδίου (Enayati et al. 2001). Ωστόσο ο συγκεκριμένος προσδιορισμός ήταν τεχνικά πολύ απαιτητικός και σχετικά μέτριας ακρίβειας, δεδομένου ότι βασιζόταν στην ανίχνευση του μη συζευγμένου υποστρώματος GSH, από το οποίο μόνο ένα μικρό μέρος χρησιμοποιούνταν για την ενζυμική αντίδραση. Σε μια άλλη εφαρμογή, ένας οπτικός βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε με σκοπό τον ταχύ και ευαίσθητο προσδιορισμό (έως και 2 ppm) του εν δυνάμει καρκινογόνου και επικίνδυνου για τα υδάτινα οικοσυστήματα, χημικού captan (Choi et al. 2003). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η μετάλλαξη Gln53Ala της GST I από αραβόσιτο οδήγησε σε αύξηση της αναστολής της δράσης του εντομοκτόνου malathion κατά 9.2-φορές σε σύγκριση με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Η μεταλλαγμένη μορφή χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου εντομοκτόνου (Karoli et al. 2008). Ο ενζυμικός αυτός προσδιορισμός ειδικότερα, ερευνά την ικανότητα του εντομοκτόνου να προωθεί την αναστολή της αντίδρασης σύζευξης CDNB/GSH και βασίζεται στην αλλαγή του pH από την καταλυτική αντίδραση η οποία μετρείται ποτενσιομετρικά χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρόδιο.

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα προσέγγιση ήταν αυτή των Hasegawa *et al.*, (2007) για τον προσδιορισμό του ακρυλαμίδιου στα αμυλούχα τρόφιμα (Hasegawa et al. 2007). Το ακρυλαμίδιο θεωρείται επικίνδυνο, για την ανθρώπινη υγεία, ουσία και για αυτόν τον λόγο απαιτείται ένας ταχύς και φθηνός τρόπος ανίχνευσης της. Το γονίδιο *gst-4* από το *C. elegans* χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός ενιαίου *gst::gfp* γονιδίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να μετατρέψει το *C. elegans* σε έναν βιοαισθητήρα ανίχνευσης ακρυλαμίδιου. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας ανιχνεύει το ακρυλαμίδιο ως εκπεμπόμενο φθορίζον σήμα κατά την έκφραση του *gst* γονιδίου, η ένταση του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα και το χρόνο έκθεσης στο ακρυλαμίδιο (Hasegawa et al. 2007).

Τα ένζυμα GSTs χαρακτηρίζονται από την καταλυτική δυνατότητα σύζευξης αλογονομένων ενώσεων με τη γλουταθειόνη. Η αντίδραση κατάλυσης πραγματοποιείται με ταυτόχρονη απελευθέρωση αλογονοϊόντων, γεγονός που αξιοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός ιδιαίτερα ταχείου ποσοτικού προσδιορισμού των ιόντων αλογόνου που παράγονται από αλογονωμένες ξενοβοτικές ενώσεις.

Ο φασματοφωτομετρικός αυτός υπολογισμός βασίζεται στην χρωματική αλλαγή που προκύπτει από την αντίδραση του $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ με τα ιόντα αλογόνου που απελευθερώνονται από το αλογονωμένο υπόστρωμα παρουσία Fe^{3+} . Η ένταση του σχηματιζόμενου χρώματος, σε αυτή την περίπτωση, είναι ανάλογη του εύρους της καταλυτικής δραστηριότητας των GST γεγονός που επιτρέπει την ποσοτική της εκτίμηση. Ο έλεγχος μιας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων GST μορφών αλλά και πιθανών αναστολέων των ενζύμων πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε μικρο-

πλακίδια, εκμεταλλεύμενοι την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα του συγκεκριμένου ενζυμικού προσδιορισμού, ο οποίος επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο πολυάριθμων δειγμάτων σε ελάχιστα λεπτά. (Skopelitou & Labrou 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ζ

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Η κλωνοποίηση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] από το pEXP5-CT/TOPO[®]TA Expression Kit της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.). Το ίδιο kit περιλαμβάνει τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* TOP10F' στα οποία πραγματοποιήθηκε η επιλογή, ο πολλαπλασιασμός και η διατήρηση των μετασχηματισμένων πλασμιδίων, καθώς και τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) στα οποία πραγματοποιήθηκε η έκφραση των περισσότερων γονιδίων της παρούσας διατριβής.

2.1.2. ENZYMA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν για τις πέψεις νουκλεϊνικών οξέων. Τα περιοριστικά ένζυμα HindIII (10 U/μL), SphI (10 U/μL) και DpnI (20 U/μL) προέρχονται από την εταιρεία New England BioLabs. Η περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI (10 U/μL) αγοράστηκε από την εταιρεία Fermentas (Γερμανία). Η Taq DNA πολυμεράση (5 U/μL) και η Pfu DNA πολυμεράση (3 U/μL) αγοράστηκαν από τους οίκους New England BioLabs (Αγγλία) και Promega (Η.Π.Α.), αντίστοιχα. Η αναγωγή του γλουταθείου (GRd) αγοράστηκε από τον οίκο Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Τα ένζυμα *GmGST2* και *GmGST10* από το φυτο σόγια (*Glycine max*), προέρχονται από το Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.1.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, KITS ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ ΥΛΙΚΑ.

Το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) (καθαρότητα 98%), η κρυσταλλική γλουταθειόνη (GSH), το ρυθμιστικό Tris, το δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS), ο 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλαιθέρας, το υδροϋπεροξείδιο του κουμενίου (CuOOH), η αλβουμίνη μόσχου (BSA) (fraction V), τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη, καναμυκίνη και το μαλεϊμίδιο αγοράστηκαν από τον οίκο Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Τα εντομοκτόνα: fenvalerate, permethrin, diazinonon, malathion, carbaryl και τα ζιζανιοκτόνα: atrazine, diuron, fluorodifen (4-νιτροφαινυλ-2-νιτρο-4-τριφθομομέθυλ-φαινυλαιθέρας), alachlor, metolachlor αγοράστηκαν από την εταιρεία Riedel de Haen (Γερμανία). Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) και η αгарόζη αγοράστηκαν από την εταιρεία AppliChem (Γερμανία) και Invitrogen (Η.Π.Α.), αντίστοιχα. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250) αγοράστηκε από τον οίκο Merck (Η.Π.Α.). Το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη και το άγαρ από την εταιρεία Scharlau (I-

σπανία). Όλα τα άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (KH_2PO_4 , NaCl , NiCl_2 κ.λ.π.) ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τον οίκο Merck (Η.Π.Α.).

Τα χρωματογραφικά υλικά Sephadex G-25, Sepharose CL6B, S-Hexyl-GSH αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

Όλοι οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Γερμανία).

Οι δείκτες μοριακών μαζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ηλεκτροφορήσεις DNA της παρούσας εργασίας ήταν οι εξής: (i) λDNA κατόπιν πέψης με EcoRI και HindIII και (ii) λDNA κατόπιν πέψης με HindIII που αγοράστηκαν από την εταιρεία Roche (Γερμανία), (iii) 1kb DNA ladder και (iv) 2-log DNA ladder από την εταιρεία New England BioLabs. Ο δείκτης μοριακών μαζών Protein Marker Broad Range (Premixed Format, P7702S) που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών, αγοράστηκε από την εταιρεία New England Biolabs.

Το QIAquick™ Gel Extraction Kit και το QIAquick™ Mini Prep Kit αγοράστηκαν από την εταιρεία Qiagen (Γερμανία). Το Sigma GenElute Plasmid Miniprep kit αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

2.1.4. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Πλαστικά ακρορύγχια (tips) της εταιρείας Costar.

Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου ή πολυστυρενίου των 15 και 50 ml από Falcon.

Πλαστικά σωληνάρια (ependorfs) 1,5 ml της εταιρείας Greiner.

Τρυβλία για στερεές καλλιέργειες της εταιρείας Vive.

Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 και 0,45 μm της εταιρείας Gelman.

Φίλτρα υπερδιήθησης της εταιρείας Amicon.

Μεμβράνες διαπίδυσης της εταιρείας Spectrum.

Μεμβράνες διαπίδυσης της εταιρείας Spectrum και φίλτρα συμπύκνωσης της εταιρείας Amicon.

Χαρτί διήθησης 1mm και 3mm της εταιρείας Whatmann.

Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης της εταιρείας Sarstedt.

Κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής για μέτρηση απορρόφησης διαλύματος.

Πλάκες μικροτιλοδότησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο της εταιρείας.

Όλα τα γυαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ή αποστειρώνονταν με υγρή αποστείρωση όπου ήταν απαραίτητο.

2.2 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής της εταιρείας PE Applied Biosystems, μοντέλο Gene Amp[®] 9700.

Οι προσδιορισμοί της ενζυμικής δραστηριότητας έγιναν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους, του οίκου Hitachi (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 10mm) που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.

Για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η ψυχόμενη κάθετη συσκευή του οίκου Hoefler, H.Π.Α., μοντέλο SE 600, συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500 x T (500 volt, 400 mA) επίσης του οίκου Hoefler, H.Π.Α.

Για τις ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή του οίκου Hoefler H.Π.Α., μοντέλο HE 99X.

Χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Heraeus SEPATECH Contrifuge 17RS και Varifuge 20RS καθώς και η Heraeus Instruments Biofuge primo.

Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με το pHμετρο ORION μοντέλο 410A.

Το λύσιμο των κυττάρων έγινε με το σύστημα υπερήχων Sonics & Materials Inc. Vibra Cell.

2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.3.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (SDS-PAGE).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (SDS-PAGE)	
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%	
Ακρυλαμίδιο	29,2% (w/v)
N,N-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο	0,8% (w/v)
Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (10 ml)	
Διάλυμα ακρυλαμιδίου (30%)	4 ml
SDS	0,1% (w/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	0,375 M
TEMED	0,05% (v/v)
Υπερθεϊτικό αμμώνιο (APS)	0,005% (w/v)

Πήκτωμα συμπύκνωσης 4% (10 ml)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου (30%)	1,3 ml
SDS 0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	0,125 M
TEMED	0,1% (v/v)
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0,005% (w/v)

Διάλυμα ηλεκτροδίων

Tris- HCl pH 8.4	0,025 M
Γλυκίνη	0,192 M
SDS	0,1 % (w/v)

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων (3X)

SDS	10% (w/v)
Tris- HCl pH 6.8	0,12 M
β-μερκαπτοαιθανόλη	10% (v/v)
ή DTT	1,234 % (w/v)
Γλυκερόλη	20% (v/v)
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0,05% (w/v)

Διάλυμα χρώσης (Stain gel)

Μεθανόλη	40% (v/v)
Οξικό οξύ	10% (v/v)
Coomassie brilliant blue R-250	0,1% (w/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού (Destain gel)

Οξικό οξύ	40% (v/v)
Μεθανόλη	10% (v/v)

2.3.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ DNA.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ DNA

50x Ρυθμιστικό διάλυμα TAE

Διάλυμα 1 L περιέχει 24,2 g Tris-base, 100 mL 0,5M EDTA pH 8, 57 mL CH₃COOH.

Βρωμιούχο αιθίδιο

5 mg/mL σε ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

Για 10 mL διαλύματος αναμιγνύονται 10 mL γλυκερόλης 50% (w/v), 200 μL EDTA 0,5 M pH 8, και 25 mg της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.

2.3.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

Για την παρασκευή 3 mL διαλύματος αναμιγνύονται 150 μL 0,5 M Tris-Cl, pH 8, 60 μL 0,5 M EDTA, pH 8 και 75 μL 2 M γλυκόζης.

Διάλυμα NaOH/SDS

Για την παρασκευή 5 mL διαλύματος αναμιγνύονται 114 μL 10 M NaOH και 568 μL 10% (w/v) SDS.

Διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /RNάσης A

Για την παρασκευή 4,5 mL διαλύματος αναμιγνύονται 4,5 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (7,5 M) pH 7,8 και 45 μL διαλύματος RNάσης A.

RNάση A

Διάλυμα RNάσης A 10 mg/mL σε 10 mM Tris-Cl pH 7,4, 15 mM NaCl. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο 100 °C για 15 min και αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) φυλάσσεται στους -20 °C.

2.3.4. ΔΙΑΛΥΜΑ TB ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Το διάλυμα TB αποτελείται από 250 mM KCl, 15 mM CaCl_2 , 10mM Pipes και 55 mM MnCl_2 . Το pH ρυθμίζεται στο 6,7 με προσθήκη διαλύματος KOH 5N πριν την προσθήκη του MnCl_2 .

2.3.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.

LB ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ

0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) πεπτόνη. Για στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (COMPETENT CELLS).

Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο να επάγει την επιδεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων BL21(DE3), BL21StarTM(DE3) και TOP10, ώστε να προσλάβουν τον πλασμιδιακό φορέα που περιέχει κλωνοποιημένο το ξένο τμήμα DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατή-

ρηση ότι βακτήρια κατεργασμένα με διαλύματα CaCl_2 στους $4\text{ }^\circ\text{C}$ και με ακόλουθη θέρμανση λίγων λεπτών μπορούν να προσλάβουν DNA, το οποίο προέρχεται από διάφορες πηγές. Πολλές παραλλαγές της βασικής τεχνικής έχουν περιγραφεί, ενώ στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Inoue et al., 1990.

Σύμφωνα με αυτή 20 ml θρεπτικού υλικού LB (Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) εμβολιάζονται με ένα από τα στελέχη των βακτηριακών κυττάρων που προαναφέρθηκαν, απουσία οποιουδήποτε αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια αυτή επώάζεται για 12-16 ώρες στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ υπό συνεχή ανάδευση στις 240 rpm. Με 10 ml από την καλλιέργεια αυτή εμβολιάζουμε 250 ml θρεπτικού υγρού LB και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ μέχρις ότου αυτή παρουσιάσει απορρόφηση $\text{OD}_{600} = 0.5-0.6$. Η καλλιέργεια ψύχεται στον πάγο για 10 λεπτά και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις $2500 \times g$ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία $4\text{ }^\circ\text{C}$. Τα κύτταρα αιωρούνται σε 80 ml (που αντιστοιχούν στο 1/3 του όγκου της καλλιέργειας) ρυθμιστικού διαλύματος TB (Transformation Buffer) όπου και αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις $3000 \times g$ και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 20 ml του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος (1/12.5 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας). Στο αιώρημα προστίθεται DMSO τελικής συγκέντρωσης 7% (v/v). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία $4\text{ }^\circ\text{C}$ με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση. Αφού παραμείνουν στον πάγο για 10 min, τα δεκτικά πλέον βακτηριακά κύτταρα μοιράζονται σε κλάσματα των 200 μl σε φιαλίδια τύπου erpendorf και καταψύχονται με υγρό άζωτο. Η διατήρηση των δεκτικών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται με την αποθήκευσή τους στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.4.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (Heat-shock)

Ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με το κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακούς φορείς DNA γίνεται ακολουθώντας την εξής διαδικασία: το αιώρημα των επιδεκτικών βακτηρίων (200 μl) στο οποίο έχουν προστεθεί 5-25ng DNA που θέλουμε να εισαγάγουμε, αφήνονται στον πάγο για 30 min και στο τέλος του χρονικού διαστήματος υπόκεινται σε θερμικό σοκ για 90 sec στους $42\text{ }^\circ\text{C}$ και στη συνέχεια αφήνονται στον πάγο για χρονικό διάστημα 2 min ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους. Ακολουθεί η προσθήκη 500 μl υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώαση στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ για 60 min. Μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις $5000 \times g$ αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και γίνεται αιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με το υπερκείμενο που εναπομένει. Το αιώρημα επιστρώνεται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB και στη συνέχεια επώάζονται στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ για 12-16 h, ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν τους ανασυνδιασμένους, με το ξένο DNA,

πλασμιδιακούς φορείς. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων γίνεται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών διότι οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό. Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τριβλίων συλλέγονται η καθεμία χωριστά και αναπτύσσονται εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνης έτσι ώστε είτε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA, είτε να ακολουθήσει έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης.

2.4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τρία στάδια: την ανάπτυξη της μεταμορφωμένης βακτηριακής καλλιέργειας, τη συλλογή και λύση των κυττάρων και το καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA. Η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας γίνεται με επώαση των βακτηρίων στους 37 °C για 16 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (100 µg/ml). Η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση στις 4000 x g για 10 λεπτά και ακολουθεί η αλκαλική λύση τους σύμφωνα με τα εξής. Το ίζημα των κυττάρων αιωρείται σε 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και στο αιώρημα προστίθεται ο διπλάσιος όγκος (400 µl) διαλύματος 0,2 N NaOH, 1% SDS. Το μίγμα ομογενοποιείται με απλή ανακίνηση του σωλήνα και αφήνεται για 5 min στο πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 300 µl ψυχρού διαλύματος 3 M CH₃COONH₄/RNάσης A και το οποίο αναδεύεται προσεχτικά και επώάζεται στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 x g για 10 min. Στο υπερκείμενο που παραλαμβάνεται γίνεται κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 0,7 mL όγκου ισοπροπανόλης και μετά από ανάδευση το δείγμα επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στην υδατική στοιβάδα που απομονώνεται μετά από φυγοκέντρηση 15 min στις 12000 x g, γίνεται κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 21 mL 70% (v/v) απόλυτης παγωμένης αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται τελικά σε 20 µl αποστειρωμένου ddH₂O και φυλάσσεται στους -20° C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.4.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μόρια DNA μήκους 0.1 - 20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0.8-2% οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1 X TAE, στα οποία προστίθεται 0,5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνται μετά από την προσθήκη ειδικού διαλύματος δείγματος (loading buffer 6x), σε σταθερής έντασης ρεύμα

110mA. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA σχηματίζουν ζώνες διακριτές λόγω φθορισμού κατά την διάρκεια έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, όπου και μπορούν να φωτογραφηθούν. Ως μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν οι λDNA/EcoRI+HindIII, λDNA/HindIII, 2-Log DNA ladder και 1kb DNA ladder.

2.4.5. ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Για την πέψη μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) που συνοδεύουν κάθε ένζυμο. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1 μg DNA με 3-5 units ενζύμου στα 20 μl συνολικού όγκου αντίδρασης.

Τα ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης του κατάλληλου προσανατολισμού της ένθεσης στα ανασυνδισμένα πλασμίδια (παραγραφος 5.3.1.). Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού SphI και XbaI. Το ένζυμο SphI προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* το οποίο φέρει το SphI γονίδιο από το *Streptomyces phaeochromogenes* (NRRL B-3559) με αλληλουχία αναγνώρισης την 5'...GCATG▼C...3' και το XbaI προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* το οποίο φέρει το XbaI γονίδιο από το *Xanthomonas badrii* (ATCC 11672) με αλληλουχία αναγνώρισης την 5'...T▼CTAGA...3' (με ▼ συμβολίζεται η θέση υδρόλυσης στην νουκλεοτιδική αλληλουχία).

2.4.6. ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Με βάση τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες των άκρων του εξεταζόμενου DNA, συντίθενται ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), συμπληρωματικοί των παραπάνω ακολουθιών. Η χρησιμοποίηση θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq, Pfu πολυμεράση) οδηγεί κάτω από προσεκτικά ελεγχόμενες συνθήκες στη σύνθεση νέων κλώνων DNA ταυτόσημων με την περιοχή μεταξύ των περιοχών των άκρων, στις οποίες δεσμεύονται οι εκκινητές. Συγκεκριμένα, τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε erpendorf χωρητικότητας 0,2 mL κατάλληλο για αντιδράσεις PCR. Οι αναλογίες των συστατικών της αντίδρασης ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραματικών διαδικασιών που απαιτούνται κάθε φορά. Στη συνέχεια αναμιγνύονται καλά, φυγοκεντρούνται ώστε να συγκεντρωθούν στον πυθμένα του erpendorf και τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή PE Applied Biosystems Gene Amp® 9700. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που συνήθως χρησιμοποιείται στα πειράματα της παρούσας εργασίας είναι το ακόλουθο: το μίγμα θερμαίνεται στους 95 °C για 2 min οπότε αποδιατάσ-

σεται το DNA. Η θερμοκρασία μειώνεται στους 55 °C για 2 min για να επιτρέψει στους εκκινητές να δεσμευθούν στις περιοχές άκρων του DNA στόχου, προς τις οποίες είναι συμπληρωματικοί. Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C για 3 min, επιτρέποντας στην πολυμεράση να συνθέσει δύο νέους κλώνους DNA, ο καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς τον αρχικό κλώνο. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 10 min. Ο κύκλος επαναλαμβάνεται και κάθε φορά οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι αποτελούν εκμαγείο για την σύνθεση νέων κλώνων. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων του αρχικού DNA σε διάστημα λίγων ωρών και 30-35 κύκλων.

2.4.7. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΟΥ DNA.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων, για την απομάκρυνση των αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων όπως η χαμηλή θερμοκρασία, η παρουσία κατιόντων που αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος και η παρουσία αιθανόλης η οποία απομακρύνει μόρια νερού και αφυδατώνει το δείγμα. Η κατακρήμνιση δειγμάτων DNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου (CH₃COONa) pH 5,2 και διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης υψηλής καθαρότητας. Τα δείγματα τοποθετούνται για 1 h στους -80 °C ή για 16 ώρες στους -20 °C και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 15-30 min σε 10000 rpm. Τα ιζήματα πλένονται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο (5-10 μL) ddH₂O.

2.4.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΤΟΥ DNA (SEQUENCING)

Οι προσδιορισμοί της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιήθηκαν από την εταιρεία MWG-Biotech AG (Γερμανία). Η μετάφραση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Translate (<http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>), διαθέσιμο από το διακομιστή μοριακής βιολογίας ExPASy.

2.4.9. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ PCR ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pEXP5-CT/TOPO®

Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα TOPO® Cloning (Invitrogen, Η.Π.Α.). Η ένθεση του προϊόντος της PCR έγινε στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO®. Αυτό το σύστημα εκμεταλλεύεται την ύπαρξη μιας βάσης αδενίνης σε κάθε άκρο του προϊόντος της

PCR, οι οποίες έχουν τοποθετηθεί από την πολυμεράση κατά την έξοδο της από το εκμαγείο. Ο πλασμιδιακός φορέας pEXP5-CT/TOPO[®], που παρέχεται σε γραμμική μορφή με μια βάση T σε κάθε άκρο, υβριδοποιείται με μεγάλη εξειδίκευση με τα προϊόντα της PCR. Η διαδικασία της κλωνοποίησης γενικά περιλαμβάνει:

- 1) Ένθεση του προϊόντος της PCR σε πλασμιδιακό φορέα και επώαση του μίγματος για 30 min στους 4-16 °C.
- 2) Εισαγωγή του πλασμιδίου στα επιδεικτικά κύτταρα *E. coli* TOP10F' του βακτηρίου.
- 3) Επιλογή και ανάλυση αποικιών για την ανίχνευση της επιτυχούς ένθεσης του προϊόντος της PCR.

Στο πρώτο στάδιο τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο (erpendorf) 1 μl πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], 4 μl προϊόντος PCR και 1 μl διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂). Η αντίδραση επωάζεται για 15-30 min στους 25 °C και διατηρείται στον πάγο. Ακολουθεί μετασχηματισμός TOP10F' δεκτικών κυττάρων.

2.4.10. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD (BRADFORD 1976).

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάφορα δείγματα. Αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης, με γνωστές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης βόειας αλβουμίνης με βάση την απορρόφηση στο ορατό, σε μήκος κύματος 595 nm. Κατόπιν μετριέται η απορρόφηση στα 595 nm του άγνωστου δείγματος και μέσω της καμπύλης υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων. Η άμεση σχέση της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον 'δεσμό' που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Αυτό που πραγματικά συμβαίνει είναι το εξής: ο 'δεσμός' της Coomassie Brilliant Blue G-250 με μια πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής από τα 465nm στα 595nm. Μετά από δύο λεπτά από την προσθήκη της χρωστικής στο δείγμα της πρωτεΐνης έχει ολοκληρωθεί η αλλαγή στο χρώμα και διατηρείται σταθερή για περίπου μία ώρα. Τα πλεονεκτήματά της είναι η ταχύτητα της μεθόδου και η ευαισθησία της. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει απόλυτες ποσότητες πρωτεΐνης 1 έως 20μg.

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

25 °C. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1/4 και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25 °C για 24 h.

Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης, προστίθενται 50 μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε 950 μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στην κυψελίδα να είναι 2-10 μg . Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25 °C για 25-35 min και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, έχοντας ως αναφορά διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.4.11. ΔΙΑΠΛΥΣΗ (DIALYSIS).

Τα ενζυμικά εκχυλίσματα πριν τον καθαρισμό τους υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι συνήθως 500 έως 1000-όγκων ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης και pH προκειμένου να αποκτήσουν την ίδια σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος με αυτό της διαπίδυσης. Για τη μέθοδο χρησιμοποιείται μεμβράνη διαπίδυσης από κυτταρίνη (μοριακό κατώφλι 12 kDa) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) η οποία αποτελεί ένα ημιπερατό διάφραγμα που επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν, αλλά δεν διαπερνάται από τα μόρια της πρωτεΐνης. Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται σε μια τέτοια μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του ελεύθερου πρωτεΐνης διαλύματος. Η διαδικασία διαρκεί 18-24 h και πραγματοποιείται στους 4 °C.

Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιείται και στις περιπτώσεις απομάκρυνσης του ιμιδαζολίου από το έκλουσμα της πρωτεΐνης *AtuGST4* μετά τον καθαρισμό της με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή με ακινητοποιημένο νικέλιο. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό είναι Tris-HCl, 0.5M, pH 8.

2.4.12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

2.4.12.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΪΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS-PAGE).

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE). Η ομοιόμορφη δέσμευση του φορτισμένου απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες τις κάνει να αποκτήσουν σταθερό αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα παρουσία ηλεκτρικού πεδίου

η κινητικότητα 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 του σε ακρυλαμίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου 12,5%. Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα αφού προστεθεί σε αυτά το ειδικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) και βραστούν για 10 min στους 95 °C για να αποδιαταχθούν. Η παρουσία του DTT (διθειοθρεϊτόλη) και της μερκαπτοαιθανόλης στο διάλυμα δείγματος προκαλεί την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών της πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στο οποίο φορτώνονται τα δείγματα είναι συγκέντρωσης 7.5% και καλείται πήκτωμα συμπύκνωσης. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 200 Volts (η ένταση του ρεύματος στην αρχή είναι περίπου 80 mA και με την πάροδο του χρόνου μειώνεται στα 32 mA) για 1 h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα κατεργάζεται με σκοπό την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα χρώσης και αποχρωματισμού.

2.4.12.2. ΧΡΩΣΗ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250.

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου κυανού χρώματος, μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα χρώσης που περιέχει μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (7% v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25-1% w/v), για 30-60 min με αργή ανακίνηση, προκειμένου να δημιουργηθεί το σύμπλοκο. Κατόπιν, αφαιρείται το διάλυμα χρώσης και ξεπλένεται επανειλημμένα σε διαλύματα αποχρωματισμού για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής και την εμφάνιση των διακριτών πρωτεϊνικών ζωνών. Χρησιμοποιούνται δύο υδατικά διαλύματα που περιέχουν: i) μεθανόλη (40% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v) και ii) μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v). Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανίχνευση μέχρι και 0.1 μg πρωτεΐνης.

2.4.13. ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTs ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. coli*.

Για την έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη της *E. coli* τα οποία παράγουν αρκετό *lac* καταστολέα ώστε να αναστέλλεται αποτελεσματικά η μεταγραφή από τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*lac* operon). Για την έκφραση της πρωτεΐνης ι-δανικό είναι το στέλεχος BL21(DE3), το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αποδοτικότερο έλεγχο της έκφρασης, γεγονός χρήσιμο ειδικά σε περιπτώσεις που το μόριο που εκφράζεται μπορεί να είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασηματίζονται με τον ανασυνδυασμένο φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] και επιστρώνονται σε τρυβλία LB με αμπικιλίνη. Δημιουργείται καλλιέργεια εκκίνησης σε LB (50ml) με 100 µg/ml αμπικιλίνης, η οποία επωάζεται όλη τη νύχτα υπό ανάδευση στους 37 °C. Νέα καλλιέργεια (500ml) προθερμασμένου LB (37 °C) με το ίδιο αντιβιοτικό, εμβολιάζεται από την καλλιέργεια εκκίνησης και επωάζεται υπό ανάδευση στους 37 °C, μέχρι η οπτική της απορρόφηση να είναι $OD_{600nm} = 0,5-0,6$. Προστίθεται στην καλλιέργεια IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και συνεχίζεται η επώαση της καλλιέργειας για 4 ώρες. Ανά μία ώρα συλλέγονται δείγματα από την καλλιέργεια, τα οποία φωτομετρούνται. Ίσες ποσότητες κυττάρων κατακρημνίζονται, και τα εκχυλίσματά τους αναλύονται σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμιδίου, ώστε να βρεθεί ο καλύτερος χρόνος επαγωγής της έκφρασης.

Τέλος, τα κύτταρα συλλέγονται (περίπου 0,15 g υγρής πάστας κυττάρων/50 mL καλλιέργειας) με φυγοκέντριση (8000 rpm) για 15 min και διατηρούνται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.4.14. ΛΥΣΙΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ.

Αιωρείται μάζα κυττάρων 0,15 g σε τριπλάσιο όγκο 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 6,5. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με επίδραση υπερήχων για τρεις επαναλήψεις χρονικής διάρκειας 15-20 s η κάθε μία. Η διαδικασία πραγματοποιείται στο παγόλουτρο (2-4°C). Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρείται (13000 rpm) για 5 min και το υπερκείμενο συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία.

2.4.15. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ 1,4-ΒΟΥΤΑΝΕΔΙΟΛ-ΔΙΓΛΥΚΙΔΥΛ-ΑΙΘΕΡΑ-GSH-SEPHAROSE-CL6B (BES-GSH).

Για τη σύνθεσή του προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλαιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (Se-GSH) χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20 g σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose CL6B), τα οποία είχαν πλυθεί με δις-απιονισμένο νερό (200 ml), και προστέθηκαν σε διάλυμα 0,6 M NaOH (20 ml) με σκοπό να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μίγματος για 3 ώρες σε θερμοκρασία 25°C. Στη συνέχεια στην ενεργοποιημένη αγαρόζη προστίθενται 4 ml 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλαιθέρα (1,4-Butanediol diglycidyl ether) και η αντίδραση ολοκληρώνεται με μια δεύτερη ήπια ανάδευση για 2 ώρες στην ίδια θερμοκρασία. Επόμενο βήμα είναι η διήθηση και το πλύσιμο του αιωρήματος με δις-απιονισμένο νερό και στη συνέχεια η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα γλουταθείου (400 µmol), το οποίο ήδη έχει διαλυθεί σε φωσφορικό διάλυμα 1 M Na₂HPO₄ pH 8 (10 ml). Το μίγμα αφήνεται για 3 ημέρες να αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και στη συνέχεια αφού ακολουθήσει διήθηση και

πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο δις-απιονισμένου νερού, αποθηκεύεται σε διάλυμα 20% αιθανόλης, στους 4 °C.

2.4.16. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH.

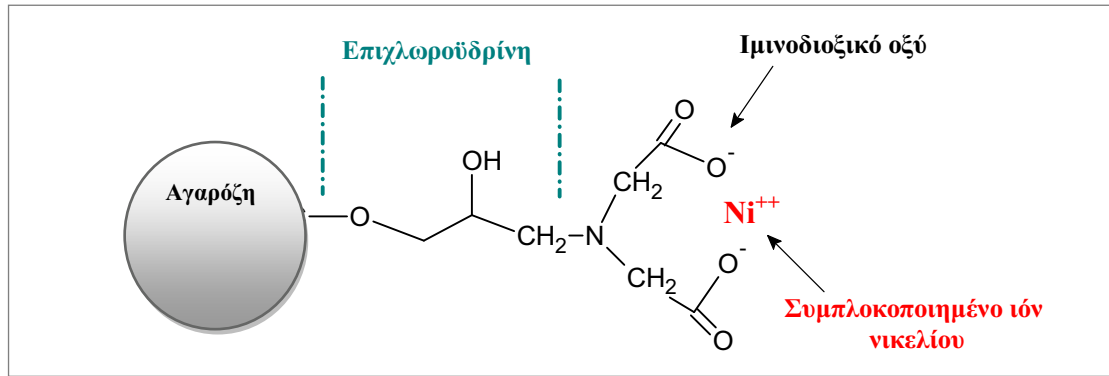
Για τον καθαρισμό των ισοενζύμων GST χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των βέλτιστων συνθηκών καθαρισμού των πρωτεϊνών που αφορούν το pH και τις συνθήκες έκλουσης των ενζύμων. Σε κάθε στάδιο του καθαρισμού υπολογίζεται η ενζυμική δραστηριότητα με τη φωτομετρική μέθοδο (παράγραφος 2.4.19.1). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (παράγραφος 2.4.10).

Το πρωτόκολλο καθαρισμού έχει ως εξής: ενζυμικό διάλυμα εξισορροπημένο σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 7, φορτώνεται σε προσροφητή BES-GSH (1 mL). Οι μη προσροφημένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης. Το ένζυμο εκλύεται με 10 mM GSH, pH 7 (3-5 mL) διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης.

2.4.17. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ Ni-NTA-ΑΓΑΡΟΖΗΣ.

Η παραγόμενη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη AtuGST4 καθαρίζεται με χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένο μέταλλο. Συγκεκριμένα, στο σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ιόντα Ni^{2+} έχουν ακινητοποιηθεί σε αгарόζη με τη βοήθεια νιτριλοτριξικού οξέος (Ni-NTA) (Σχήμα 2.1). Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στα ιόντα Ni^{2+} της στήλης με πολύ υψηλή συγγένεια και εκλύονται με ανταγωνιστική πρόσδεση ιμιδαζολίου (φυσιολογικές συνθήκες).

Αρχικά ο προσροφητής NTA-αγαρόζη 0.5ml αναγεννάται με 5 ml διαλύματος EDTA 0,1 M και 10ml dd H₂O. Στη συνέχεια, ο προσροφητής φορτίζεται με διάλυμα NiCl₂·6H₂O 50 mM, όγκου 2ml, το οποίο παρασκευάζεται εκ νέου για κάθε διαδικασία καθαρισμού. Ακολουθεί εξισορρόπηση της στήλης με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ 50 mM περιεκτικότητας 0,3 M σε NaCl, pH 8.



ΣΧΗΜΑ 2.1. Δομή του προσροφητή με συμπλεγμένα ιόντα Ni^{+2} σε ακινητοποιημένο ιμινοδιοξικό οξύ.

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα όγκου 1.5ml φορτώνεται και αφού το ένζυμο προσροφηθεί, πραγματοποιείται έκπλυση του προσροφητή με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 50mM περιεκτικότητας 0.3M σε NaCl, pH 8 και με 10ml του ίδιου διαλύματος με pH 6.2, ώστε να απομακρυνθούν το μη-προσροφημένο στη στήλη υλικό και οι χαλαρά δεσμευμένες πρωτεΐνες. Ακολουθούν εκλούσεις της πρωτεΐνης με ιμιδαζόλιο διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης χρησιμοποιώντας σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται 5 εκλούσεις με: α) δ/μα ιμιδαζολίου 5mM, β) 20mM, γ) 0.1M, δ) 0.2M και ε) 0.5M. Συλλέγονται κλάσματα των 2 mL και γίνεται έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 2.4.14.1) και προσδιορισμός της πρωτεΐνης (παράγραφος 2.4.11).

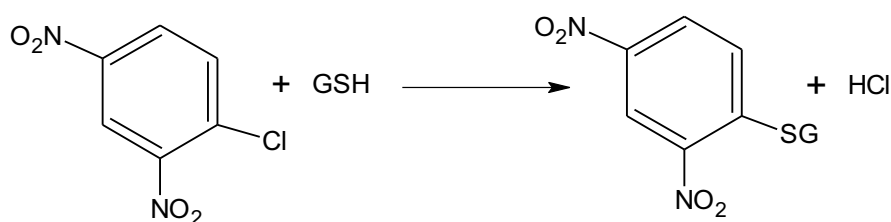
2.4.18. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής κινητικής, της αδρανοποίησης των ενζύμων, της εύρεσης του IC_{50} , των τιμών T_m έγινε χρήση του προγράμματος SigmaPlot (<http://www.sigmaplot.com>). Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών στοιχείων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html, Krissinel & Henrick, 2007). Οι χάρτες Ramachandran σχεδιαστήκαν με τη βοήθεια των λογισμικών RAMPAGE (Lovell et al., 2002) και VMD 1.8.6 (Humphrey et al., 1996, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα iMolTalk (<http://i.mol.talk.org/>). Οι απεικονίσεις των τριτοταγών δομών των πρωτεϊνών παρήχθησαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα PyMOL (Delano, 2002) και Jmol (<http://www.jmol.org/>).

2.4.19. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΥ (GST).

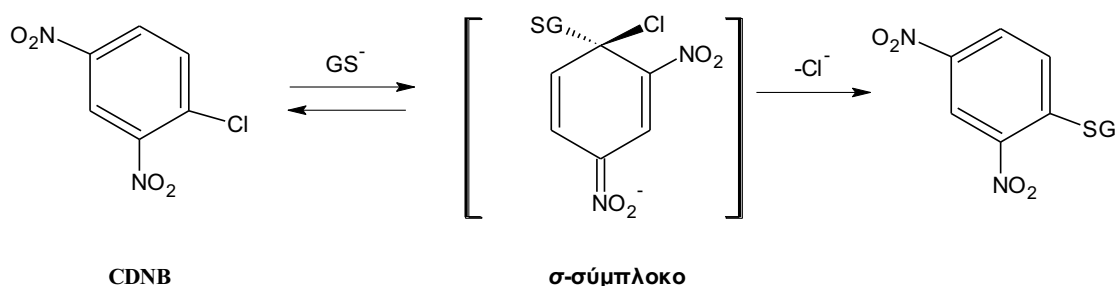
2.4.19.1. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΝΙΤΡΟΒΕΝΖΟΛΙΟΥ CDNB, BDNB, FDNB, IDNB, PNBC ΚΑΙ NBD-Cl ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.

Η διαδικασία μέτρησης της δραστηριότητας της GST με τα αλογωνομένα 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-νιτοβενζο-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 (Labrou et al., 2001). Οι νουκλεόφιλες αντικαταστάσεις ενός αλκυλ- ή αρυλ- αλογόνου (Σχήμα 2.1.) ήταν οι πιο συχνά απαντώμενες αντιδράσεις. Τα αλογόνα των μορίων αυτών είναι ήπια ηλεκτρονιόφιλα άτομα και αντιδρούν άμεσα με τη GSH. Η γενική αντίδραση που ακολουθείται είναι της μορφής:



ΣΧΗΜΑ 2.2. Ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση ενός ατόμου χλωρίου από την σουλφυδρυλομάδα της GSH.

Ο προσδιορισμός της GST δραστηριότητας πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το CDNB ως υπόστρωμα. Αυτή είναι μια νουκλεόφιλη αρωματική υποκατάσταση που πραγματοποιείται μέσω ενός ενδιάμεσου σ-συμπλόκου (Σχήμα 2.2.) (Armstrong, 1997, Hayes et al., 2005).

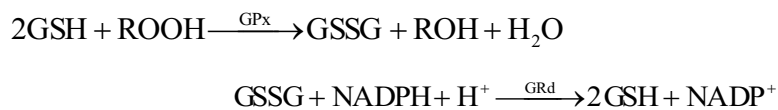


ΣΧΗΜΑ 2.3. Σχηματισμός του ενδιάμεσου σ-συμπλόκου κατά τη σύζευξη της GSH με το CDNB.

Το μίγμα επώασης έχει συνολικό όγκο 1 mL και τοποθετείται σε κυψελίδα όγκου 1,5 ml η οποία περιέχει 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 6,5, 2,5 mM GSH, ένζυμο GST (έως 0,02 U) και 1 mM υποστρώματος, ενώ ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 340nm για τα υποστρώματα CDNB, BDNB, FDNB και IDNB. Για το υπόστρωμα PNBC η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ανέρχεται στα 5mM και ο φωτομετρικός προσδιορισμός πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 310nm. Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol υποστρώματος σε σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη ανά min στους 37 °C.

2.4.19.2. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΑ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ CuOOH ΚΑΙ tert-BuOOH.

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός μέτρησης της δραστηριότητας της GST με το υδροϋπεροξειδιο του κουμενίου (CuOOH) και το τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδιο (t-BuOOH) πραγματοποιήθηκε συμφωνά με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί από τον Tappel, 1978. Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 0,6 mL περιέχει 1 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 U ενζύμου ρεδοκτάσης του γλουταθείου (Sigma, St. Louis, MO) και 1,5mM τελική συγκέντρωση υποστρώματος, CuOOH ή t-BuOOH σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 7.5) με 0.1 mM EDTA. Στη συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται αναγωγή των υπεροξειδίων και σχηματισμός του δισουλφιδίου του GSH (GSSG) συμφωνά με τις αντιδράσεις:



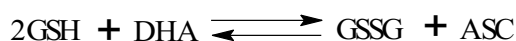
Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και προσδιορίζεται η ταχύτητα μετατροπής του NADPH σε NADP⁺ σε μήκος κύματος 340 nm. Ως ενζυμική μονάδα ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol NADPH σε NADP⁺ ανά min στους 37 °C. Για τον ποσοτικό υπολογισμό του NADPH χρησιμοποιείται ως συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 6,22 L/mmol·cm (Wilson et al., 1989). Όλοι οι ενζυμικοί προσδιορισμοί διορθώθηκαν για τη μη ενζυμική αντίδραση η οποία λάμβανε χώρα στις συνθήκες του πειράματος.

2.4.19.3. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΟ HED (2,2-ΔΙΘΕΙΟΔΙΑΙΘΑΝΟΛΗ).

Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει 0,5 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 0,5 U ενζύμου ρεδουκτάσης του γλουταθείου (Sigma, St. Louis, MO) και ποσότητα καθαρού ενζύμου σε 100mM ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Cl (pH 7,8). Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 2mM υποστρώματος 2,2-διθειοδιαιθανόλης (HED) στους 30°C η οποία ακολουθείται από μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340nm. Για τον ποσοτικό υπολογισμό του NADPH χρησιμοποιείται ως συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 6,22 L/mmol·cm (Wilson et al., 1989).

2.4.19.4. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΟ DHA (ΔΙΥΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ).

Η GST καταλύει την αναγωγή του διυδροασκορβικού οξέος (DHA) σε ασκορβικό χρησιμοποιώντας την ανοιγμένη γλουταθειόνη ως δότη ηλεκτρονίων (Mizohata et al., 2001). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 265 nm.

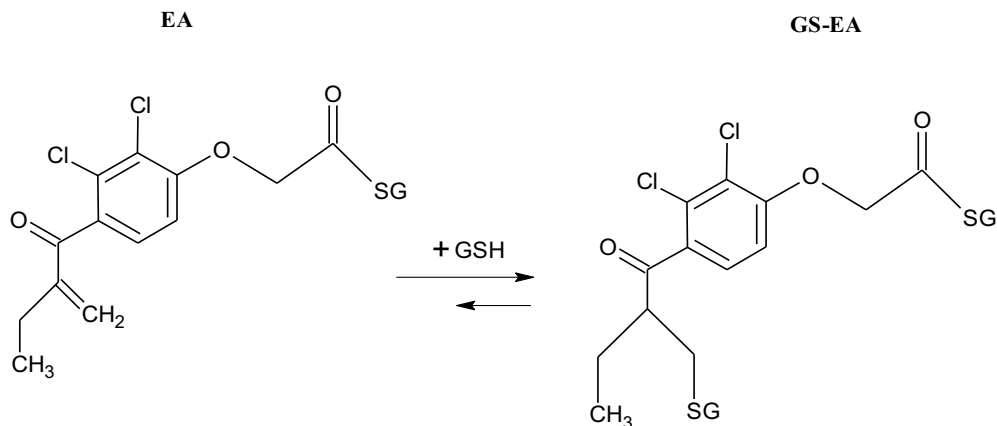


Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 3 mL περιέχει 1 mM GSH και 0,25mM τελική συγκέντρωση υποστρώματος διυδροασκορβικού οξέος σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 8).

2.4.19.5. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΑ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ EA ΚΑΙ trans-4-ΦΑΙΝΥΛΒΟΥΤ-3-EN-2-ΟΝΗ.

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των GSTs έναντι του αιθακρυνικού οξέος (EA) δηλαδή ουσιαστικά 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 αιθακρυνικό περιέχει ακόρεστο δεσμό που μπορεί να σχηματίσει διάφορες ενώσεις προσθήκης με νουκλεόφιλες ομάδες. Η αντίδραση προσθήκης του αιθακρυνικού με τη GSH οδηγεί στον σχηματισμό του συμπλόκου GS-EA (Σχήμα 2.3.). Κατά παρόμοιο τρόπο, η ακόρεστη ομάδα της trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνης δημιουργεί σύμπλοκο με τη γλουταθειόνη.

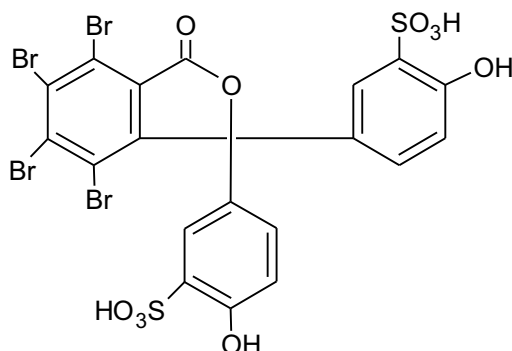
Η αντίδραση, τελικού όγκου 3ml, περιείχε 0,25mM GSH και 0,2mM ή 0,05mM υποστρώματος για το αιθακρυνικό οξύ και η *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη αντίστοιχα σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 6,5. Η χρονική διάρκεια του προσδιορισμού ήταν συνήθως 3 min. Τα υποστρώματα λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του στο νερό διαλύονταν σε αιθανόλη ή ακετόνη η τελική συγκέντρωση των οποίων στο διάλυμα του προσδιορισμού ήταν μικρότερη από 4%. Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί διεξάγονταν σε μήκος κύματος 270nm για το αιθακρυνικό και 290nm για την *trans*-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη.



ΣΧΗΜΑ 2.4. Σχηματισμός του συμπλόκου EA-GSH.

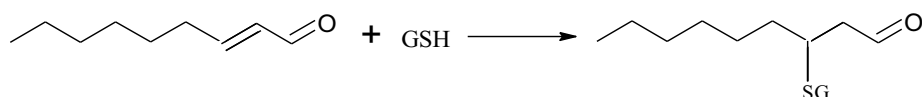
2.4.19.6. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ BSP (ΒΡΩΜΟΣΟΥΛΦΟΦΘΑΛΕΪΝΗ) ΚΑΙ HNE (*trans*-2-ΕΝΕΝΑΛΗ).

Συμφωνά με τους Javitt et al., 1960, Goldstein & Combes 1966, ο λακτονικός δακτύλιος του BSP (Σχήμα) μπορεί πιθανότατα να αντιδράσει με την ανοιγμένη GSH σχηματίζοντας έναν θειοαιθέρα και με αντικατάσταση του βρωμίου πάνω στον δακτύλιο του φθαλικού οξέος οδηγείται στον σχηματισμό υδροβρομικού οξέος.



ΣΧΗΜΑ 2.5. Συντακτικός τύπος της βρωμοσουλφοφθαλεΐνης.

Η αντίδραση προσθήκης συμβαίνει και στην περίπτωση του υποστρώματος trans-2-ενενάλη (Hiratsuka et al., 2001) η οποία διαθέτει μια ελεύθερη αλδευδομάδα συμφωνά με την παρακάτω αντίδραση:



Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί και για τα υποστρώματα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη και trans-2-ενενάλη διεξάγονται σε μήκη κύματος 330nm και 224nm, αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις, τελικού όγκου 3ml, πραγματοποιούνται σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 6,5. Για τη βρωμοσουλφοφθαλεΐνη, το μίγμα της αντίδρασης περιέχει 5mM GSH και 0,03mM υποστρώματος και για την trans-2-ενενάλη 0,5mM GSH και 0,1mM υποστρώματος.

2.4.19.7. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ: ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ ΚΑΙ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟΣ ΑΛΛΥΛ-ΕΣΤΕΡΑΣ.

Οι οργανικές ισοθειακυανικές ενώσεις ισοθειακυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας και ισοθειακυανικός αλλυλ-εστέρας δημιουργούν προϊόντα σύζευξης με τη γλουταθειόνη ενζυμικά και μη ενζυμικά προς σχηματισμό διθειοκαρβαμιδίων (Zhang et al., 1996, Meyer et al., 1995) όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση:

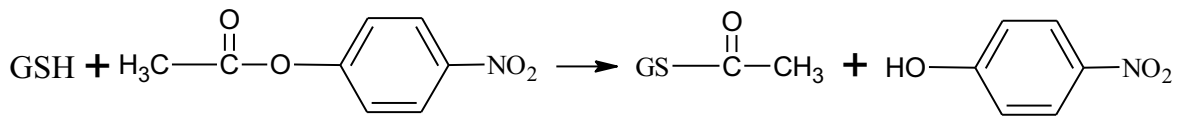


Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 3 mL είναι ίδιο και για τα δυο υποστρώματα και περιέχει 1 mM GSH και 0,4mM υποστρώματος σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,5). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 274nm.

2.4.19.8. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΟ p-NPA.

Στην περίπτωση των εστέρων, όπως το υπόστρωμα οξική p-νιτροφαινόλη, η νουκλεόφιλη προσβολή από την θειολική ομάδα της γλουταθειόνης συμβαίνει στην εστερική ομάδα (Σχήμα).

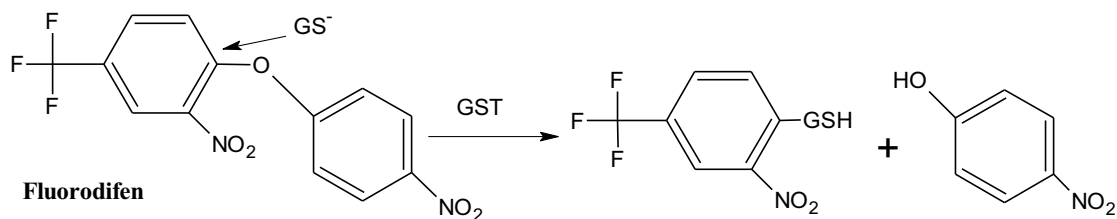
Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 1 mL περιέχει 2,5 mM GSH και 1 mM υποστρώματος σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,5). Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 410nm.



ΣΧΗΜΑ 2.6. Αντίδραση τρανσακετυλίωσης στο μόριο της οξικής p-νιτροφαινόλης

2.4.19.9. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GST ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ FLUORODIFEN

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης κατά την αντίδραση του GSH με το fluorodifen, σύμφωνα με την αντίδραση (Dixon et al., 2003):

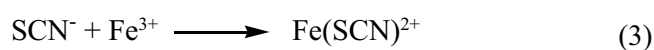


Το μίγμα επώασης έχει τελικό όγκο 1 mL και περιέχει 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα Gly-NaOH pH 9,5, 5 mM GSH, 0,05 mM fluorodifen, και GST. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 h. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα επώασης που όμως δεν περιέχει το ένζυμο. Μετά το πέρας της 1 h λαμβάνεται απορρόφηση στα 400 nm που οφείλεται στο σχηματισμό της 4-νιτροφαινόλης. Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη με-

τατροπή ενός 1 μmol fluorodifen σε 4-νιτροφαινόλη ανά min στους 30 °C. Για τον ποσοτικό υπολογισμό της 4-νιτροφαινόλης χρησιμοποιείται ως συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 18,5 L/mmol·cm (Dixon et al., 2003).

2.4.19.10. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΟΓΟΝΟΪΟΝΤΩΝ.

Η απελευθέρωση ιόντων αλογόνου από ένα αλογονουποκατεστημένο υπόστρωμα είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης σύζευξης του με τη γλουταθειόνη η οποία καταλύεται από τις GSTs. Ο προσδιορισμός αυτών των αλογονοιοντων βασίζεται στη μέθοδο που υιοθετήθηκε από τους Iwasaki et al., 1952. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο τα ελεύθερα αλογονοϊόντα αντιδρούν με τον θειοκυανιούχο υδράργυρο για να σχηματίσουν HgX_2 και SCN^- τα οποία προσδίδουν πορτοκαλί χρώμα στο διάλυμα του νιτρικού οξέος παρουσία ιόντων σιδήρου. Η συνολική πορεία των αντιδράσεων συνοψίζεται στις εξισώσεις (1) (2) και (3). Ο προσδιορισμός του χρώματος του θειοκυανιούχου σιδήρου που σχηματίζεται γίνεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 460nm και η συγκέντρωση των ιόντων αλογόνου που απελευθερώνονται προσδιορίζεται με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης διαλυμάτων NaCl γνωστών συγκεντρώσεων. Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που ελευθερώνει 1 μmol αλογονοϊόντος ανά λεπτό στους 30 °C.



Σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων προστίθεται σε κάθε φρεάτιο συνολικός όγκος 200 μl σε από τα παρακάτω αντιδραστήρια: 180 μl MES buffer pH 6.5, 2,5 mM GSH, 0,2 mM υποστρώματος και 10 μl (0,001U) ενζύμου με ακόλουθη ανάδευση. Ως τυφλά χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που δεν περιέχουν ένζυμο. Η πλάκα επώάζεται στους 30 °C και 37 °C για 30 min . Στη συνέχεια προστίθεται μαλεϊμίδιο σε τελική συγκέντρωση 10mM σε κάθε φρεάτιο και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται. Το μαλεϊμίδιο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας «μπλοκαρίσματος» του θείου της γλουταθειόνης και επομένως η προσθήκη του οδηγεί σε απενεργοποίηση της αντίδρασης. Η επαγωγή χρώματος, χαρακτηριστική της ύπαρξης ελεύθερων αλογονοϊόντων στο διάλυμα, επιτυγχάνεται με την προσθήκη 31,25 μl $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ (τε-

λικη συγκέντρωση 2 mM) και 12,5 μl Fe(NO₃)₃ (τελική συγκέντρωση 20 mM) σε κάθε φρεάτιο. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ιόντων αλογόνου που απελευθερώνονται προσδιορίζεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 460 nm και θερμοκρασία 30 °C.

Κάθε τιμή της απορρόφησης αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συγκέντρωση ιόντων αλογόνου (mg/l) στην πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 460 nm η οποία κατασκευάζεται με διαλύματα NaCl γνωστής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια κατασκευάζονται οι γραφικές παραστάσεις απορρόφησης-χρόνου, όπου η κλίση της ευθείας ισούται με $\Delta A/\Delta t$ (όπου ΔA , η μεταβολή της απορρόφησης και Δt ο χρόνος στον οποίο συμβαίνει η μεταβολή) και ταχύτητας αντίδρασης-συγκέντρωσης υποστρώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός εν-
ζύμων της οικογένειας GST από
Agrobacterium Tumefaciens

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βακτηριακές τρανσφεράσες της γλουταθειόνης αποτελούν μέρος μιας υπεροικογένειας ενζύμων που παίζουν ρόλο-κλειδί στην κυτταρική αποτοξίνωση. Οι GSTs κατανέμονται ευρέως στους προκαρυώτες και ομαδοποιούνται σε διάφορες τάξεις. Οι βακτηριακές GSTs εμπλέκονται σε μια ποικιλία διακριτών διαδικασιών όπως είναι η βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών, η προστασία έναντι του χημικού και οξειδωτικού στρες και η αντίσταση έναντι αντιμικροβιακών φαρμάκων (Gulick & Fahl, 1995).

Η ικανότητα των βακτηριακών GST να αποικοδομούν τοξικούς περιβαλλοντικούς ρύπους, τους δίνει μια σημαντική και εξέχουσα θέση στον τομέα της βιοαποικοδόμησης και σφέστατα στον τομέα της βιοεξυγίανσης του περιβάλλοντος. Η βιοεξυγίανση αποτελεί μια πολύτιμη διαδικασία ‘καθαρισμού’ των τοξικών περιβαλλοντικών ενώσεων με τη χρήση μικροοργανισμών οι οποίοι αποικοδομούν τις τοξίνες και τις μετατρέπουν σε λιγότερο τοξικές ή μη τοξικές ουσίες (Chesney et al. 1996, Hyeyoung & Youn-Kyoo, 2010).

Οι βακτηριακές GSTs εξειδικεύονται σε τέτοιες διαδικασίες και μηχανισμούς αποτοξίνωσης. Έχουν την ικανότητα να αποτοξινώνουν ένα μεγάλο αριθμό μορίων μέσω σύζευξης με τη GSH. Οι βακτηριακές GSTs συμμετέχουν ειδικότερα στην αποικοδόμηση πολλών μονοκυκλικών αρωματικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων χημικών όπως το τολουόλιο, ξυλόλια, φαινόλες και ατραζίνη (Santos et al., 2002). Επιπροσθέτως, συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, μια κατηγορία επικίνδυνων χημικών ενώσεων τόσο για το περιβάλλον όσο και για την ανθρώπινη υγεία. Εξαιρουμένου του ρόλου τους στην αποτοξίνωση, οι βακτηριακές GSTs συμμετέχουν σε μεταβολικές διαδικασίες όπως είναι η βιομετατροπή του διχλωρομεθανίου, η αποικοδόμηση της λιγνίνης και ατραζίνης και η αναγωγική αποχλωρίωση της πενταχλωροφαινόλης (Hofer et al., 1994, Kanaly & Harayama, 2000, Mueller et al., 1990, Wang et al., 1996).

Οι ευκαρυωτικές GSTs συνήθως υποκινούν την αδρανοποίηση, αποικοδόμηση ή απέκκριση ενός ευρέους φάσματος ενώσεων μέσω σχηματισμού προϊόντων σύζευξης με τη γλουταθειόνη. Στα βακτήρια, αντιθέτως, οι λίγες GSTs για τις οποίες είναι γνωστά τα υποστρώματα στα οποία εξειδικεύονται, όπως η απαλογονάση του διχλωρομεθανίου, η εποξειδάση του 1,2-διχλωροεποξυαιθανίου και η ρεδουκτάση της τετραχλωρουδροκινόνης, είναι καταβολικά ένζυμα με απαραίτητο ρόλο στη βιοδιάσπαση δύσκολα αποικοδομήσιμων χημικών (Lloyd-Jones & Lau, 1997, Xia et al., 2005, Cavalca et al., 2007). Επιπλέον, οι βακτηριακές GSTs σε αντίθεση με τις ευκαρυωτικές, εμφανίζουν μικρή ενζυμική δραστηριότητα έναντι ηλεκτρονιό-

φιλων χημικών ενώσεων όπως αλογονωμένες αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις, υπεροξειδία και εποξειδία, ισοθειοκυανιούχες ενώσεις και πρωτεϊνικά δισουλφίδια και ειδικεύονται στην κατάλυση εξειδικευμένων αντιδράσεων. Πληροφορίες που έχουν αποκωδικοποιηθεί από αλληλούχιση βακτηριακών γονιδιωμάτων δείχνουν ότι GSTs είναι παρούσες σε μεγάλα ποσοστά σε πρωτεοβακτήρια. Παράδειγμα αποτελούν τα γονιδιώματα τριών ψευδομονάδων που το καθένα περιελάμβανε τουλάχιστον δέκα διαφορετικές GSTs (Vuilleumier & Pagni, 2002).

Ο χαρακτηρισμός θηλαστικών GSTs καθίσταται ευκολότερος λόγω της χαρακτηριστικής δραστηριότητας που εμφανίζουν έναντι του υποστρώματος 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB) και της ικανότητας τους να δεσμεύονται σε προσροφητές συγγένειας με ακινητοποιημένο GSH. Οι περισσότερες γνωστές βακτηριακές GSTs, εντούτοις, στερούνται και των δυο αυτών χαρακτηριστικών (Fahey & Sundquist, 1991, Sheehan & Casey, 1993, Penninckx & Elskens, 1993), και αυτό εν μέρει εξηγεί γιατί λιγοστοί αντιπρόσωποι βακτηριακών GSTs ήταν γνωστοί κυρίως πριν την έναρξη των μεγάλης κλίμακας εργασίες αλληλούχισης γονιδιωμάτων (Vuilleumier 1997). Η ανακάλυψη, ωστόσο, ενζύμων GSTs όπως η απαλογονάση του διχλωρομεθανίου σε μεθυλοτροφικά βακτήρια (Scholtz et al. 1988, Leisinger et al., 1994, Scholtz et al., 1988) καθώς και ο καθαρισμός και λεπτομερής χαρακτηρισμός των GST ενζύμων από το στέλεχος *P. mirabilis* (Di Ilio et al., 1988) και *E. coli B* (Iizuka et al., 1989) άλλαξαν τη συγκεκριμένη πεποίθηση. Η εύρεση και ο χαρακτηρισμός ενζύμων GST με πρωτότυπες λειτουργίες που απομονώθηκαν από βακτήρια, μας παρέχουν καινούριες πληροφορίες για τις ιδιότητες και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των GSTs σε βακτηριακούς οργανισμούς.

Ορισμένες βακτηριακές GSTs εκφράζονται σε αρκετά υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικά, εμπλέκονται στον βασικό μεταβολισμό και εφοδιάζουν έτσι τα βακτηριακά κύτταρα με πηγές άνθρακα (Masip et al., 2006). Ένα στοιχείο επίσης που θεωρείται συχνά χαρακτηριστικό των βακτηριακών GSTs είναι οι τιμές K_m για τη γλουταθειόνη που κυμαίνονται σε μονάδες τάξης μεγέθους mM (Meyer, 1993) και συχνά θεωρούνται χαρακτηριστικές για ένζυμα της θ τάξης. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ακόμη και ανάμεσα σε GST που ανήκουν στην ίδια τάξη όσον αφορά την κινητική τους συμπεριφορά και την ικανότητα καθαρισμού τους με χρωματογραφία συγγένειας που βασίζεται σε ακινητοποιημένη γλουταθειόνη ή παράγωγα της (Nishida et al., 1994, Vuilleumier et al., 2009).

Μελέτες που αφορούν τη φυλογενετική ανάλυση των ενζύμων GSTs δείχνουν ότι η φυλογένεια των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Γενικά ταξινομούνται σε τέσσερις διαφορετικές οικογένειες GSTs: τις κυτοπλασματικές, τις μικροσωματικές (MAPEG), τις μιτοχονδριακές και τις βακτηριακές GSTs (Hayes et al., 2005, Armstrong,

2000). Επιπλέον, καθεμία από τις τέσσερις οικογένειες πρωτεϊνών GSTs περιέχει μέλη τα οποία σαφώς σχετίζονται εξελικτικά, αλλά παρόλα αυτά επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών GSTs καθορίζονται με βάση τα γνωστά λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά τους, επιτρέποντας την κατάταξη τους σε διαφορετικές τάξεις. Τέσσερις διαφορετικές τάξεις GSTs έχουν εντοπιστεί στα βακτήρια: β , χ , θ και ζ (Sheehan et al., 2001, Wiktelius & Stenberg G, 2007, Rossjohn et al., 1998, Vuilleumier S, 1997). Η β τάξη περιλαμβάνει την πλειοψηφία των βακτηριακών GSTs. GSTs β τάξης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορα βακτήρια. Η πρώτη GST που χαρακτηρίστηκε και ανήκει στη συγκεκριμένη τάξη, προέρχεται από ένα στέλεχος του βακτηρίου *Proteus mirabilis* (PmGST) (Di Ilio et al., 1988, Iizuka et al., 1989, Piccolomini et al., 1989, Arca et al., 1990, Di Ilio et al., 1991, Di Ilio et al., 1993, Nishida et al., 1994, Hofner et al., 1994, Zablotowicz et al., 1995, Jung et al., 1996, Favalaro et al., 1998, Travensolo et al., 2008). Τα ένζυμα θ τάξης στα βακτήρια αντιπροσωπεύονται από δυο απαλογονάσες διχλωρομεθανίου (DCM) που παράγονται από μεθυλοτροφικά βακτήρια (Scholtz et al., 1988, La Roche & Leisinger (1990), Bader & Leisinger (1994), Vuilleumier et al., 2001, Stourman et al., 2003). Οι απαλογονάσες τετραχλωροϋδροκινόνης (TCHQ) από την άλλη, όπως αναφέρεται από τους Anandarajah et al. (Anandarajah et al., 2000), ανήκουν στη ζ τάξη. Πρόσφατα μάλιστα, προτάθηκε μια καινούρια τάξη GSTs, η χ τάξη (Wiktelius & Stenberg, 2007). Τα ένζυμα που ανήκουν στη χ τάξη σχετίζονται στενά με την β τάξη η οποία όπως προαναφέρθηκε περιλαμβάνει την πλειοψηφία των βακτηριακών GSTs. Συγκεκριμένα, δυο πολύ σημαντικά μέλη της χ τάξης αποτελούν οι δυο κυανοβακτηριακές GSTs που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (TeGST) και *Synechococcus elongates* PCC 6301 (SeGST).

Το *Agrobacterium tumefaciens* το οποίο μελετάται στην παρούσα εργασία είναι ένα απρωτεοβακτήριο της οικογένειας *Rhizobiaceae*, μέλος του γένους *Agrobacterium*. Το συγκεκριμένο βακτήριο το οποίο ζει στο έδαφος, είναι υπεύθυνο για την ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών, που ονομάζεται κορονωτός κάλλος και οφείλεται σε μόλυνση των (πληγωμένων) φυτικών ιστών. Για την ακρίβεια, οφείλεται στην παρουσία του πλασμιδίου Ti (Tumor inducing) στα κύτταρα του *Agrobacterium tumefaciens*.

Ο συνδυασμός ενός ευθύγραμμου και ενός κυκλικού χρωμοσώματος αποτελεί μοναδικό και σπάνιο χαρακτηριστικό ανάμεσα στα βακτήρια. Ελάχιστα μέλη του γένους *Agrobacterium* το διαθέτουν (Jumas-Bilak, et al., 1998) και ένα από αυτά είναι και το *A. tumefaciens* C58, το οποίο αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής. Μια φυλογενετική σύγκριση με αλλά βακτήρια αποκαλύπτει ότι το πρωτόωμα του *A. tumefaciens* παρουσιάζει περισσότερες

ομοιότητες με εκείνο δυο άλλων ριζόβιων ειδών, του *S. meliloti* και του *M. loti* (Cangelosi et al., 1987), γεγονός που δείχνει ότι πιθανότατα προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο.

Στο *Escherichia coli* και σε άλλα πρωτεοβακτήρια τόσο η γλουταθειόνη όσο και τα ένζυμα που εξαρτώνται από αυτήν, μεταξύ των οποίων και οι GSTs, εμπλέκονται σε μια πληθώρα μεταβολικών διαδικασιών. Το *Agrobacterium tumefaciens* κωδικοποιεί πολλές πρωτεΐνες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν το περιβάλλον από τις επιπτώσεις τοξικών ενώσεων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι GSTs.

Οι βακτηριακές GSTs μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο για ένα πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Στον τομέα της βιοεξυγίανσης, για παράδειγμα, αποτελούν μια εναλλακτική οικονομικά μέθοδο στις συμβατικές φυσικοχημικές μεθόδους για τον καθαρισμό περιβαλλοντικά επιβαρυσμένων περιοχών. Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί ερευνώντας τη δυναμική των GST χρησιμοποιώντας τόσο φυσικά ένζυμα όσο και γενετικά τροποποιημένα με πρωτεϊνική μηχανική. Παράδειγμα εφαρμογής της πρωτεϊνικής μηχανικής σε GSTs αποτελεί η τεχνική του DNA shuffling όπως παρουσιάζεται από τους Kurtovic et al., 2008. Μετά από υβριδισμό έξι α τάξης GSTs προέκυψαν χιμαιρικά ένζυμα με βελτιωμένες καταλυτικές δυνατότητες και τροποποιημένη εξειδίκευση έναντι διάφορων επιβλαβών ιωδοαλκανίων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα.

Αλλά ανασυνδυασμένα χιμαιρικά ένζυμα GST δείχνουν να βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα της φαρμακευτικής, στο περιβάλλον (Yan et al., 2008) αλλά και σε βιοαισθητήρες (Karoli et al., 2008). Ένας μεγάλος αριθμός βακτηριακών ειδών έχουν αναπτύξει τη δυνατότητα να αποικοδομούν ξενοβιοτικές ουσίες που μέχρι πρότινος θεωρούνταν μη αποικοδομήσιμες (Timmis & Pieper, 1999). Τα παραδείγματα που προαναφερθήκαν τονίζουν τις δυνατές βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και των βακτηρίων. Από αυτή τη σκοπιά, οι βακτηριακές GSTs οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα και ένα μεγάλο εύρος εκλεκτικότητας, συνιστούν αδιαμφισβήτητα ένα αποτελεσματικό και πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας και ανάπτυξης.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA.

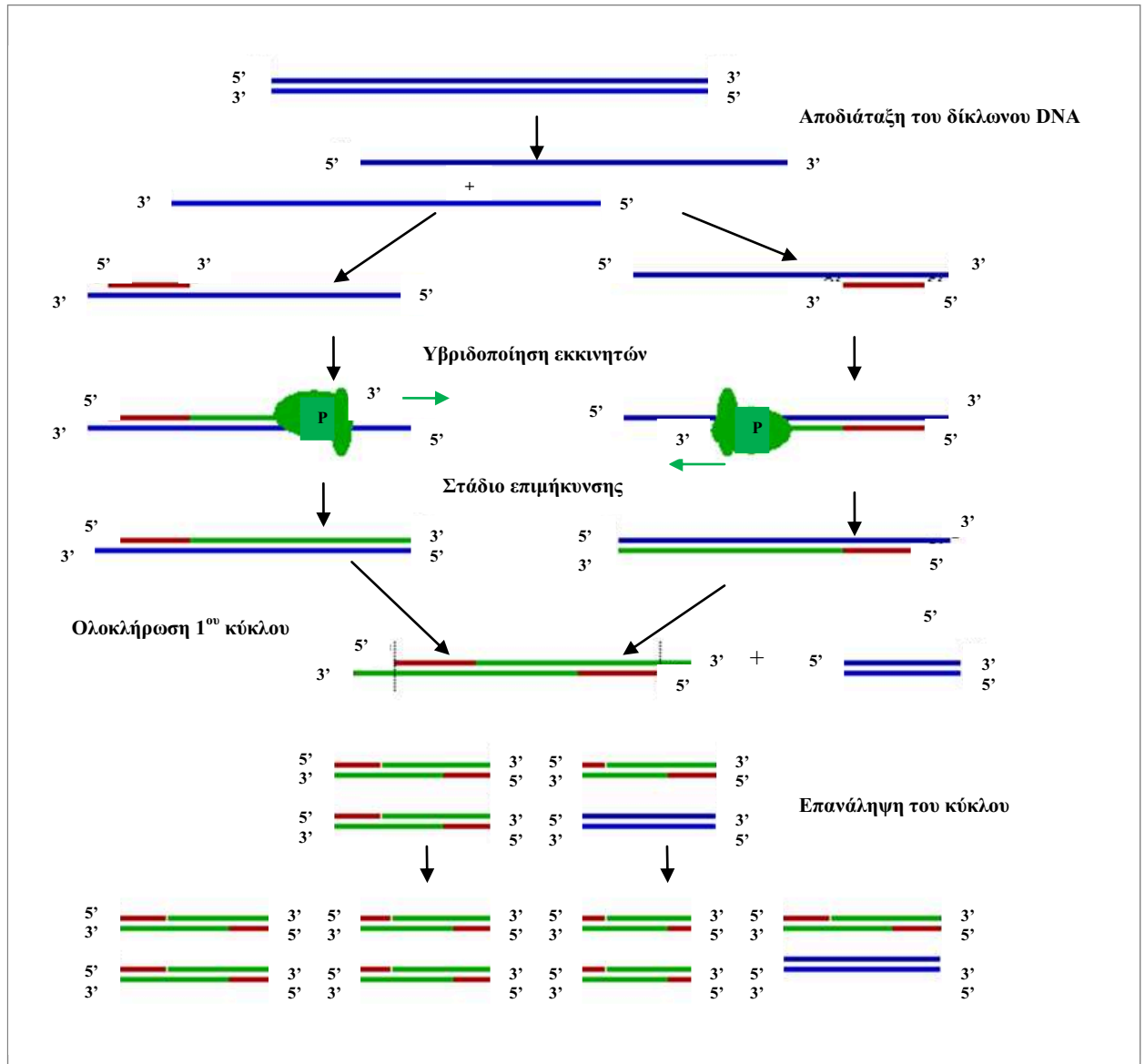
Η απομόνωση γενωματικού DNA από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C.58 πραγματοποιείται συμφωνά με το GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (<http://www.sigmaaldrich.com>). Μετά την απομόνωση τα δείγματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζη 0.5% (w/v).

3.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Με σκοπό να πραγματοποιηθεί πολλαπλή αντιγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις GST πρωτεΐνες *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Mullis and Falloona, 1987). Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται ο σχεδιασμός ζευγών υποκινητών για όλα τα γονίδια (Πίνακας 3.1). Η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων DNA καταλύεται από τη θερμοσταθερή DNA πολυμεράση Taq παρουσία dNTPs. Η πορεία της PCR απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συνήθως για την αύξηση της ποσότητας DNA μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (εκκινητές) για μια σειρά από συνθετικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από μία DNA πολυμεράση (πχ. Taq πολυμεράση) ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, επιτυγχάνεται η *de novo* σύνθεση της περιοχής του DNA που πλαισιώνεται από τους δύο εκκινητές. Το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητής είναι συμπληρωματικό (i) με μια από τις δύο διαφορετικές αλυσίδες της μήτρας DNA και (ii) με τη γειτονική αλληλουχία του προς αύξηση τμήματος DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Το μίγμα της αντίδρασης στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία, η οποία επιτρέπει την αναδιάταξη των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες και τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων εναρκτήριων μορίων με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές (25-35 κύκλοι) και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Το διάλυμα της αντίδρασης στο τέλος n κύκλων είναι δυνατόν να περιέχει θεωρητικά 2^n μόρια DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στα εναρκτήρια μόρια. Οι κύκλοι αντίδρασης περιλαμβάνουν:

- i. Αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 94°C
- ii. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA στους 56-60°C (ανάλογα με τους εκκινητές)
- iii. Επιμήκυνση του DNA από την Taq πολυμεράση στους 72°C



ΣΧΗΜΑ 3.1. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Με P συμβολίζεται η DNA πολυμεράση. Στο τέλος του πρώτου κύκλου οι δυο DNA κλώνοι που προκύπτουν αποτελούν την πλασμιδιακή μήτρα για τον επόμενο κύκλο, διπλασιάζοντας έτσι την ποσότητα του DNA που επαναλαμβάνεται για κάθε νέο κύκλο.

Μετά από επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις PCR καθοριστήκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των συστατικών και συνθηκών της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης και η κάθε μια περιέχει σε συνολικό όγκο 50 μL τα

παρακάτω αντιδραστήρια: 1μL MgCl₂ (25 mM), 0,2 mM από καθένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTPs), 1 U Taq DNA πολυμεράσης (Promega, U.K.), 8 pmol από τον κάθε εκκινητή (Πίνακας 3.1) και 5 ng DNA ως μήτρα.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών υπολογίστηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών από την παρακάτω εξίσωση:

$$T_d = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/n$$

Όπου n είναι το μέγεθος και %GC η επί τοις εκατό περιεκτικότητα γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) στον εκκινητή. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR είναι το ακόλουθο: η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 94 °C για 5 min. Ακολούθησαν 35 κύκλοι του 1 min στους 94 °C, 1 min στην επιθυμητή κάθε φορά θερμοκρασία η οποία καθορίζεται από την παραπάνω εξίσωση και 2 min στους 72 °C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 10 min.

3.2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8* για έναν αριθμό υποστρωμάτων. Οι μέθοδοι για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς της ενζυμικής δραστηριότητας των υπό μελέτη ενζύμων περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.4.19.1. (για τα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), 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)), 2.4.19.2. (για τα υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (CuOOH) και τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (t-BuOOH)), 2.4.19.3. (για τη 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED)), 2.4.19.4. (για το διυδροασκορβικό οξύ (DHA)), 2.4.19.5. (για τα αιθακρυνικό οξύ (EA) και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη), 2.4.19.6. (για τα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) και trans-2-ενενάλη (HNE)), 2.4.19.7. (για τα ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας), 2.4.19.8. (για την οξική p-νιτροφαινόλη (p-NPA) και 2.4.19.9. (για το fluorodifen).

3.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν, απομονώθηκαν με τη μέθοδο QIA-quick™ Mini Prep Kit και στάλθηκαν στην εταιρεία MWG-Biotech AG (Γερμανία) για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους χρησιμοποιώντας ως εκκινήτη τον T7-forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση του σωστού αναγνωστικού πλαισίου.

3.2.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΪΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ.

Η εύρεση και σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-Βασικό εργαλείο αναζήτησης τοπικής ευθυγράμμισης) του δικτυακού τόπου NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και τα αποτελέσματα επεξεργαστήκαν με τα προγράμματα ClustalW (Thompson et al., 1994) και Geneious 4.7.6 (Steve Rozen et al., 2000).

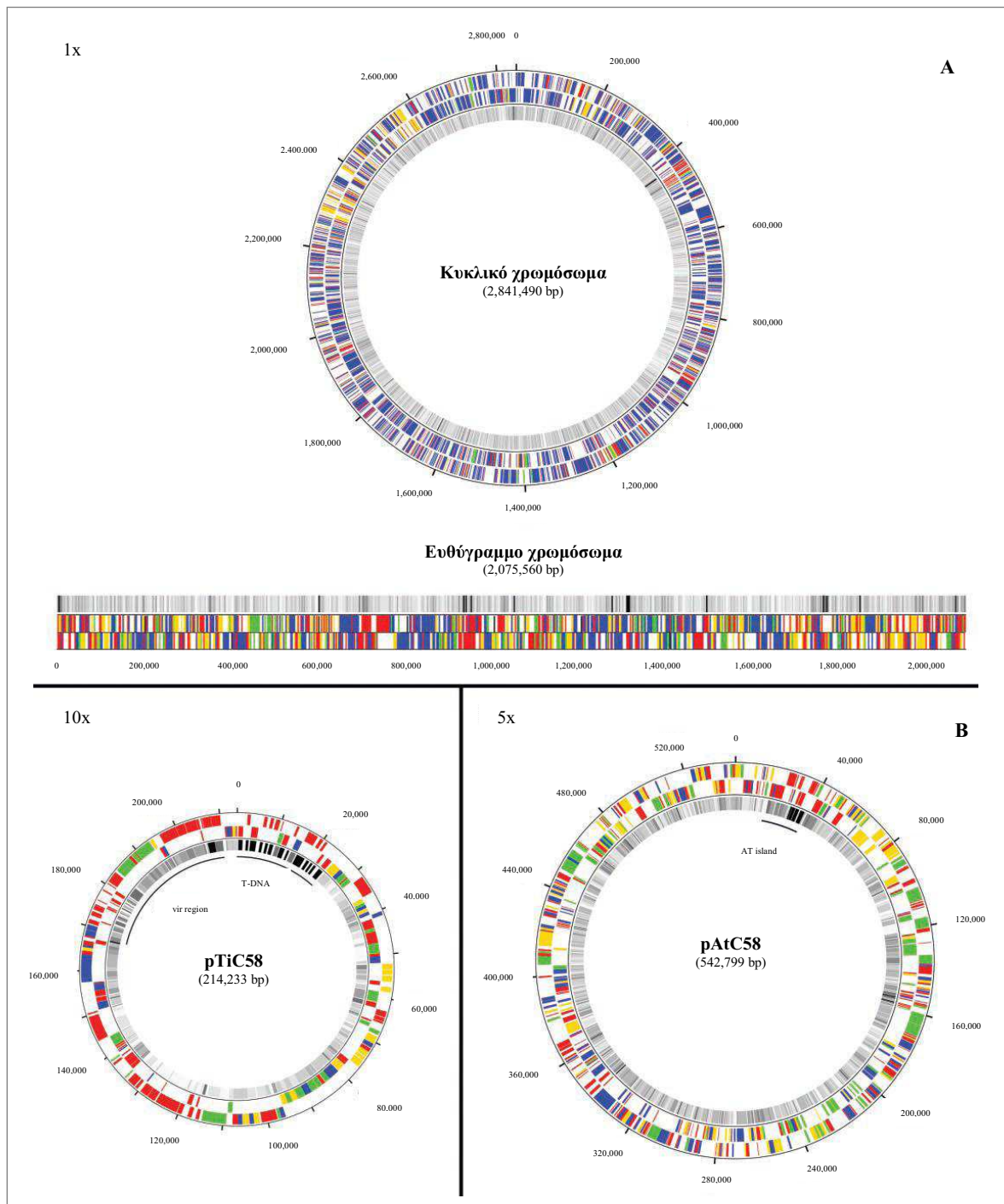
Η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Geneious 4.7.6 (Steve Rozen et al., 2000). Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων UPGMA και Neighbour-Joining που χρησιμοποιήθηκαν, έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου Phylip (Felsenstein, 1989).

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ GST ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* STRAIN C58 ΣΕ ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.

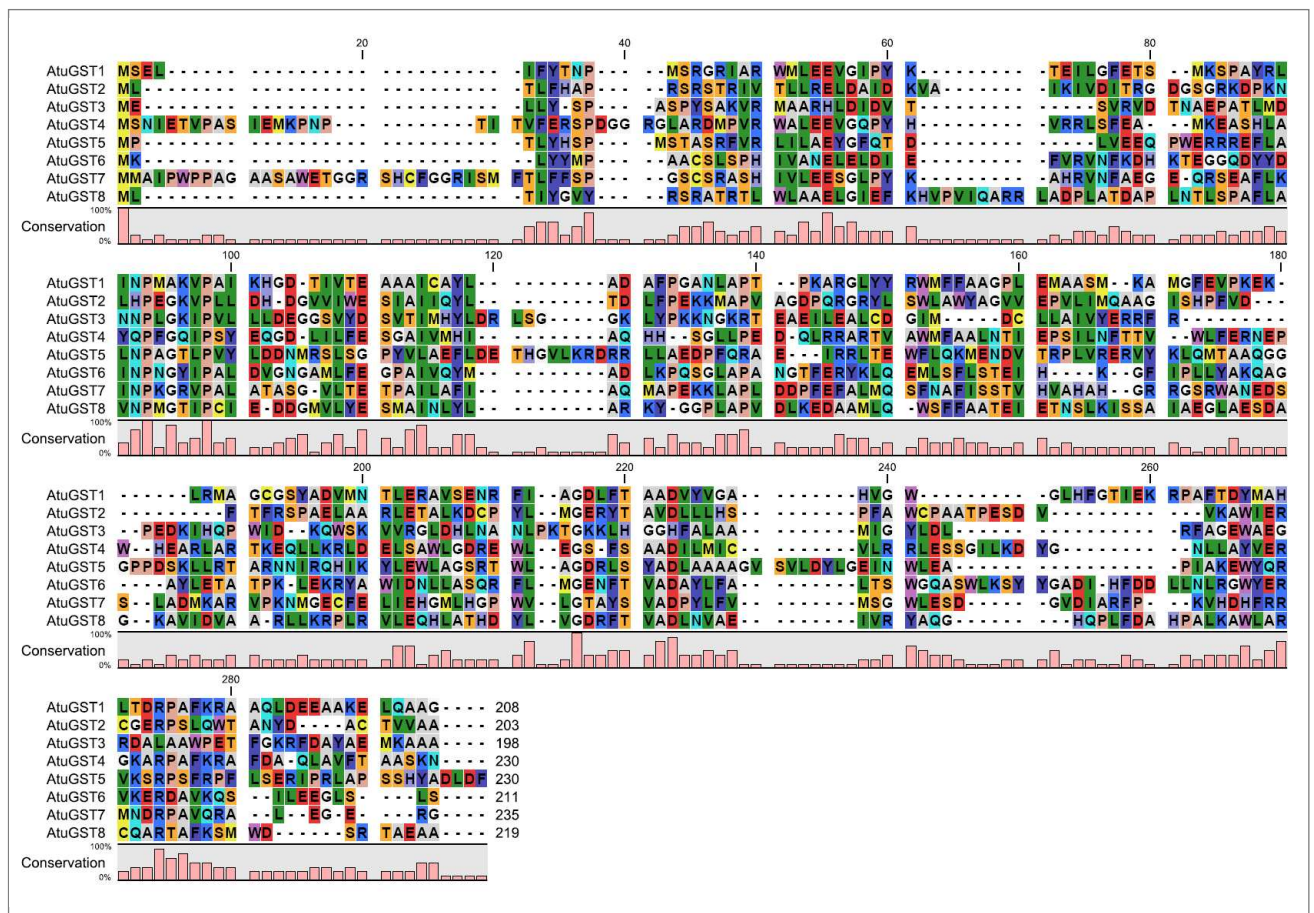
Το γονιδίωμα από το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* C58 έχει πλήρως αποκωδικοποιηθεί. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι 5,67-Mb και περιλαμβάνει τέσσερα ρεπλικόνια: ένα κυκλικό χρωμόσωμα, ένα ευθύγραμμο χρωμόσωμα και τα πλασμίδια AtC58 και TiC58 (Σχήμα 3.2). Στο γονιδίωμα του περιέχονται συνολικά 5419 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες από τις οποίες αυτές που έχουν χαρακτηριστεί με συγκεκριμένη λειτουργία αποτελούν το 64,1% κατανεμημένες στα τέσσερα ρεπλικόνια. Τα υπόλοιπα 1944 γονίδια (35,9%) περιλαμβάνουν 1236 συντηρημένα υποθετικά γονίδια (22,8%) των οποίων τα προϊόντα είναι παρόμοια με πρωτεΐνες άγνωστων λειτουργιών που υπάρχουν σε άλλα γονιδιώματα και 708 υποθετικά γονίδια που δεν εμφανίζουν ομοιότητα με καμία από τις γνωστές αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων (η αλληλούχιση του γονιδιώματος πραγματο-

πούθηκε στα Cereon Genomics/University of Richmond και DuPont/Univ. of Washington/Univ. of Campinas (Wood et al. 2001, Goodner et al., 2001)).



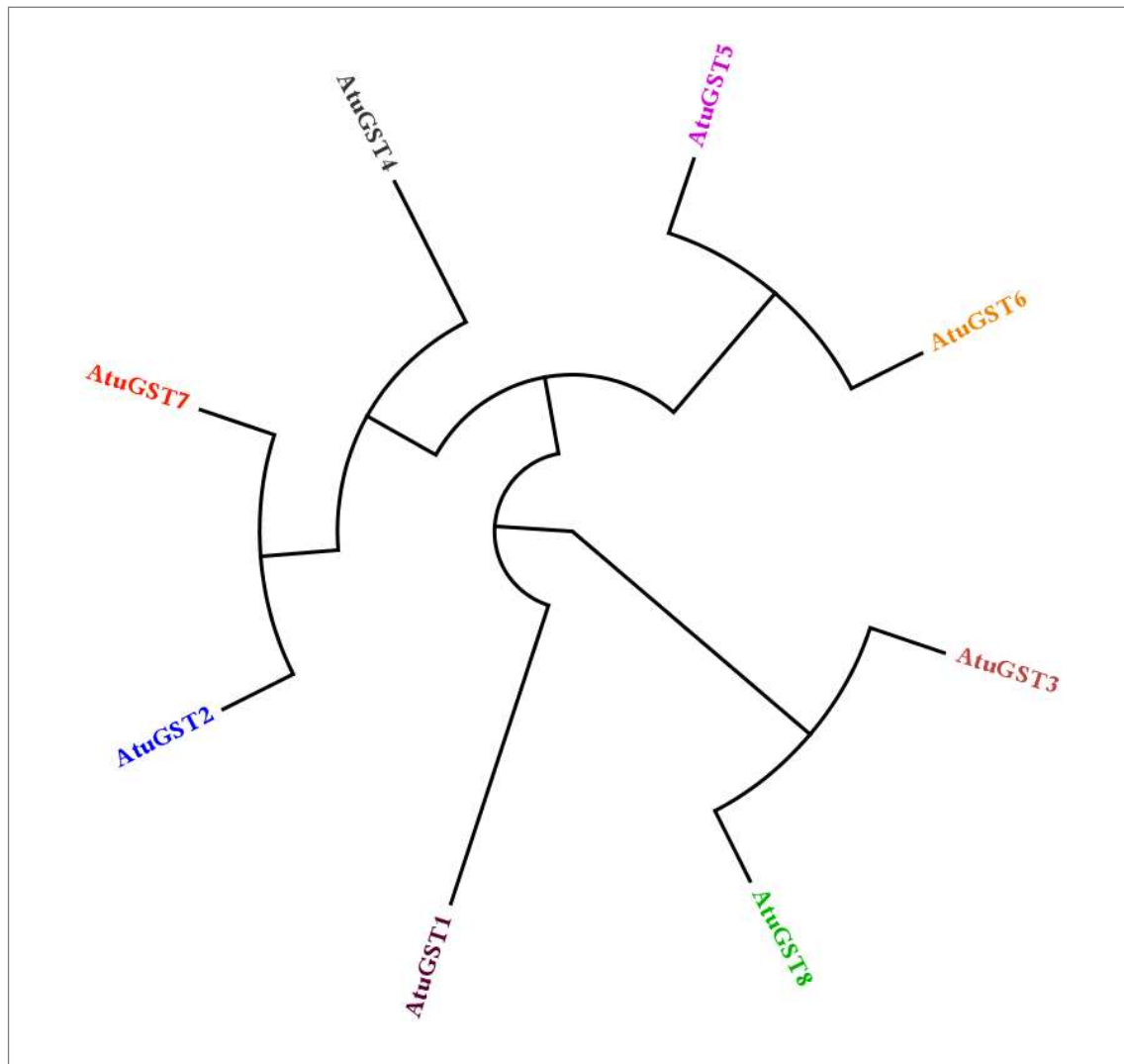
ΣΧΗΜΑ 3.2. Διαγραμματική απεικόνιση του γονιδιώματος του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* C58. A: το κυκλικό και ευθύγραμμο χρωμόσωμα B: τα πλασμίδια AtC58 και TiC58. Παρουσιάζεται η λειτουργική οργάνωση των πλασμιδίων Ti και τα μεγέθη (bp) των τεσσάρων ρεπλικόνιων.

Για την εύρεση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν πιθανές GSTs στο συγκεκριμένο βακτήριο πραγματοποιείται αναζήτηση στις αντίστοιχες ψηφιακές τράπεζες δεδομένων. Μετά την εύρεση των ισοενζύμων GSTs πραγματοποιείται ομοπαράθεση και πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών τους (ClustalW, Thompson et al., 1994). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναλυθήκαν με το πρόγραμμα Geneious 4.7.4 και παρουσιάζουν τις συντηρημένες αμινοξικές περιοχές των πρωτεϊνών καθώς και τον βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους (έγχρωμες γραμμές identity) (Σχήμα 3.3). Επιλεχθήκαν συνολικά 8 ισοένζυμα GST οι οποίες βρίσκονται στο κυκλικό χρωμόσωμα του βακτηρίου (5 GST), στο AT πλασμίδιο (2 GST) και στο ευθύγραμμο χρωμόσωμα (1GST). Στο πλασμίδιο TiC58 του *Agrobacterium tumefaciens* C58 δεν εντοπίστηκε καμία πρωτεΐνη που να ανήκει στην ομάδα ενζύμων GST.



ΣΧΗΜΑ 3.3. Ομοπαράθεση και πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των 8 ισοενζύμων (*AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, *AtuGST8*) GST που προέρχονται από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58. Παρουσιάζονται οι συντηρημένες αμινοξικές περιοχές και ο βαθμός ομοιότητας που εμφανίζουν μεταξύ τους (έγχρωμες μπάρες). Το σκούρο πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε ποσοστό ομοιότητας 100%, ενώ με κόκκινο απεικονίζονται οι λιγότερο όμοιες αμινοξικές περιοχές. Η ανάλυση και η σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Geneious 4.7.6 (Steve Rozen et al., 2000).

Το πρόγραμμα ClustalW βασισμένο στις κατά ζεύγη ευθυγραμμίσεις ζευγών ακολουθιών, υπολογίζει το βαθμό ομοιότητας κάθε ακολουθίας με τις υπόλοιπες. Τα ισοένζυμα GSTs από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 εμφανίζουν ομοιότητα μόλις 18,8% (Πίνακας 3.1), σύμφωνα με το πρόγραμμα ClustalW. Ο βαθμός ομοιότητας αυτός δείχνει και τη εξελικτική απόσταση ανάμεσα στις ακολουθίες, κάτι που απεικονίζει και το φυλογενετικό δένδρο που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4.



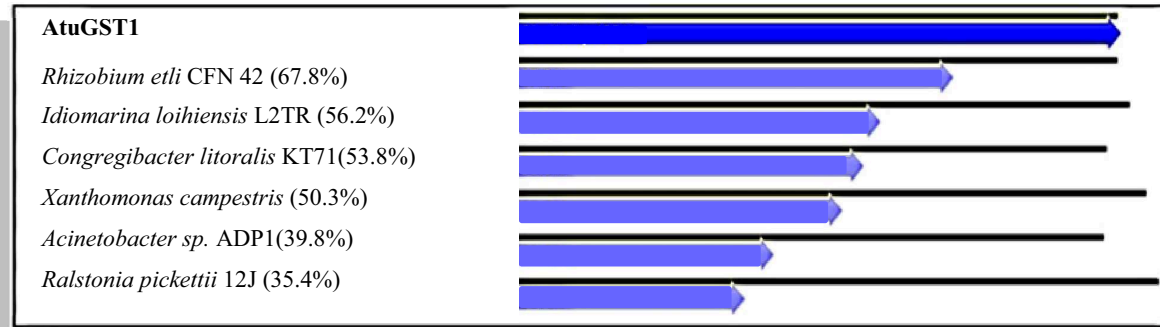
ΣΧΗΜΑ 3.4. Φυλογενετικό δένδρο πολικής μορφής κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbour-Joining. Παρουσιάζεται η εξελικτική σχέση μεταξύ των ισοενζύμων GSTs *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, *AtuGST8* από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58. Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1. Ποσοστά ομοιότητας (%) μεταξύ των ισοενζύμων του *Ag. Tumefaciens* C58.

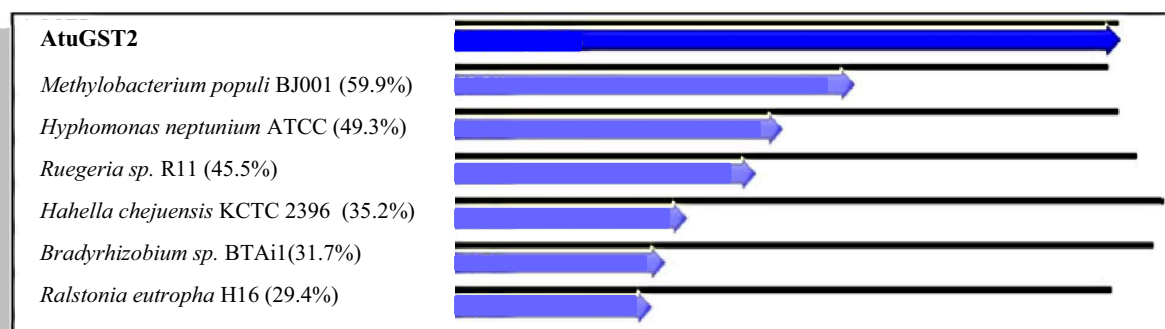
Ισοένζυμο	<i>AtuGST1</i>	<i>AtuGST2</i>	<i>AtuGST3</i>	<i>AtuGST4</i>	<i>AtuGST5</i>	<i>AtuGST6</i>	<i>AtuGST7</i>	<i>AtuGST8</i>
<i>AtuGST1</i>	100	24,9	20	25,4	20,9	23	24,2	27,7
<i>AtuGST2</i>	24,9	100	23,5	20,1	19,3	26,6	20,7	27,2
<i>AtuGST3</i>	20	23,5	100	22,8	20,4	24	18	23,9
<i>AtuGST4</i>	25,4	20,1	22,8	100	22	23	22,7	26,9
<i>AtuGST5</i>	20,9	19,3	20,4	22	100	20,2	20,1	24,2
<i>AtuGST6</i>	23	26,6	24	23	20,2	100	24,9	24,7
<i>AtuGST7</i>	24,2	20,7	18	22,7	20,1	24,9	100	21,6
<i>AtuGST8</i>	27,7	27,2	23,9	26,9	24,2	24,7	21,6	100

Επιπροσθέτως, πραγματοποιείται σύγκριση των ισοενζύμων προς τις αλληλουχίες των λειτουργικά γνωστών GSTs από διαφορετικούς οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με ευθυγράμμιση της αλληλουχίας του κάθε ισοενζύμου με αλληλουχίες που κωδικοποιούν ήδη χαρακτηρισμένες GSTs. Η διαδικασία εύρεσης ομόλογων πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul 1997) μέσω του δικτυακού τόπου National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών υποδεικνύει τον βαθμό ομοιότητας του κάθε ισοενζύμου με τις ομόλογες του πρωτεΐνες (Σχήματα 3.5, 3.6). Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται γραφικά ο βαθμός συγγένειας των ομόλογων πρωτεϊνών (γαλάζια βέλη) για κάθε ισοένζυμο (μπλε βέλη), ενώ οι μαύρες ευθείες δείχνουν το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας κάθε πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα επεξεργαστήκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Geneious 4.7.6 (Steve Rozen et al., 2000).

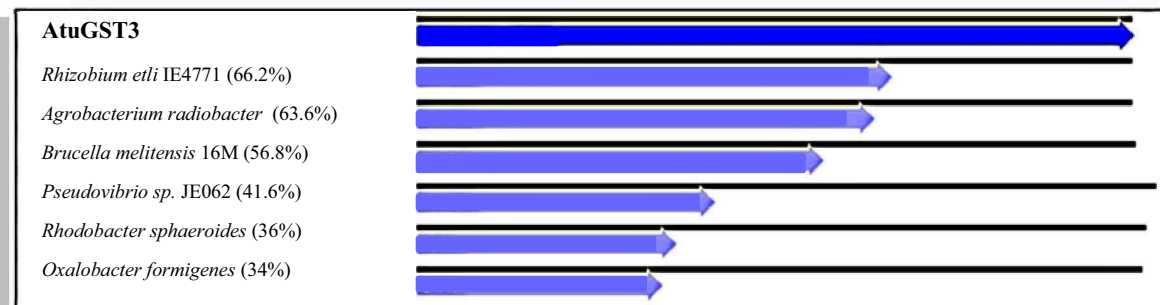
A



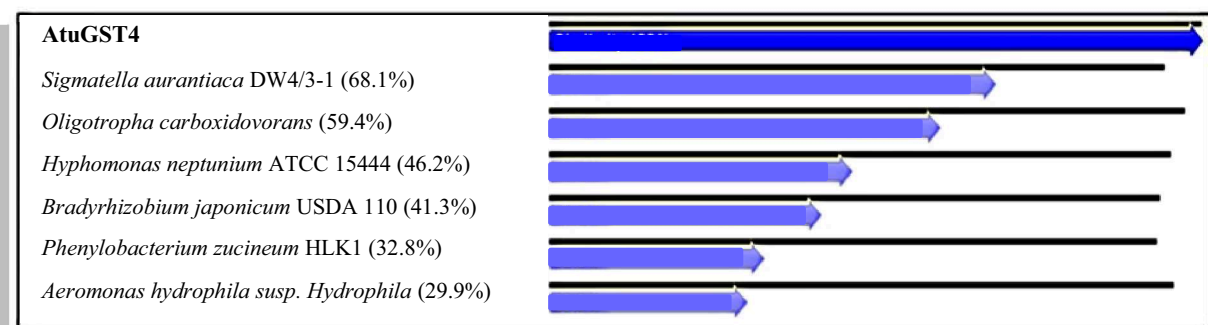
B



Γ



Δ

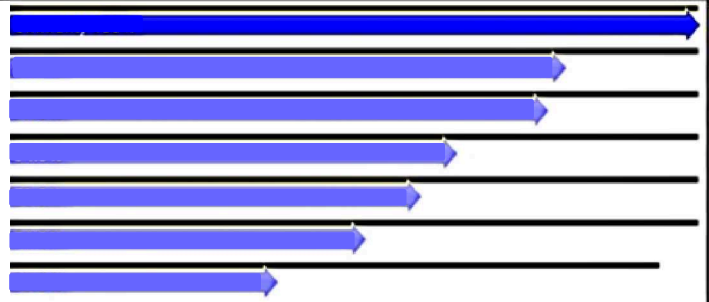


ΣΧΗΜΑ 3.5. Διαγραμματική απεικόνιση της ομοιότητας (σε ποσοστά %) κάθε ισοενζύμου GST (μπλε χρώμα) από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 με ομόλογες πρωτεΐνες από άλλα βακτήρια (γαλάζιο χρώμα). Το μήκος των αμινοξικών αλληλουχιών απεικονίζεται με μαύρες γραμμές. Η ανάλυση και η σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Geneious. Οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται οι αμινοξικές ακολουθίες καθώς και ο αριθμός καταχώρησης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων NCBI παρουσιάζονται παρακάτω: (Οργανισμός, αριθμός καταχώρισης στη NCBI) **A.** *AtuGST1: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAL42867.1), *Rhizobium etli CFN 42* (ABC91100.1), *Idiomarina loihiensis L2TR* (AAV80890.1), *Congregibacter litoralis KT71* (EAQ96293.1), *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10* (CAJ22979.1), *Acinetobacter sp. ADP1* (CAG67383.1), *Ralstonia pickettii 12J* (EAX42011.1), **B.** *AtGSTB: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK90649.1), *Methylobacterium populi BJ001* (ACB80785.1), *Hyphomonas neptunium ATCC 15444* (ABI75466.1), *Ruegeria sp. R11* (EEB72698.1), *Hahella chejuensis KCTC 2396* (ABC33351.1), *Bradyrhizobium sp. BTai1* (ABQ38582.1), *Ralstonia eutropha HI6* (CAJ92780.1), **Γ.** *AtuGST3: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK86935.1), *Rhizobium etli IE4771* (ZP_03519627), *Agrobacterium radiobacter K84* (ACM26081.1), *Brucella melitensis 16M* (YP_001627377.1), *Pseudovibrio sp. JE062* (EEA95610.1), *Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029* (ABN75184.1), *Oxalobacter formigenes OXCC13* (ACDQ01000000), **Δ.** *AtuGST4: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK89703.1), *Sigmatella aurantiaca DW4/3-1* (EAU64477.1), *Oligotropha carboxidovorans* (ACI92541.1), *Hyphomonas neptunium ATCC 15444* (ABI75767.1), *Bradyrhizobium japonicum USDA 110* (BAC50615.1), *Phenylobacterium zucineum HLK1* (ACG77359.1), *Aeromonas hydrophila susp. Hydrophila ATCC 7966* (ABK38517.1).

A

AtuGST5

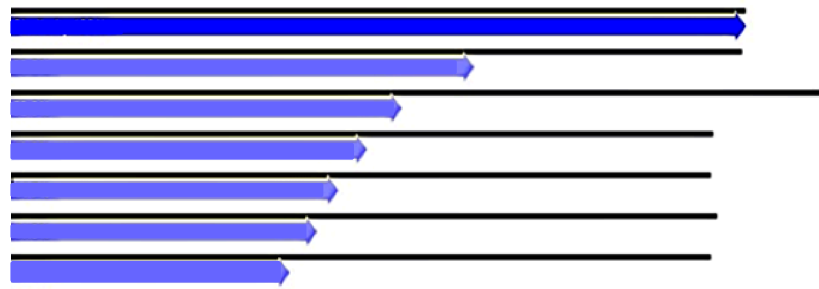
Rhizobium etli CFN 42 (80.4%)
Sinorhizobium meliloti 1021 (77.8%)
Candidatus Liberibacter asiaticus (64.8%)
Bartonella grahamii as4aup (59.6%)
Nitrobacter winogradskyi Nb-255 (51.3%)
Wolbachia en. Onchocerca volv. (38.8%)



B

AtuGST6

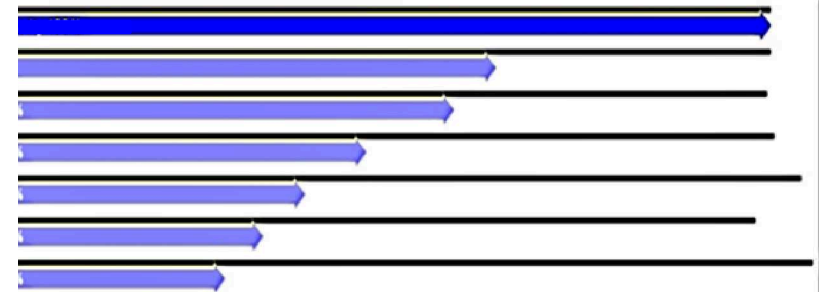
Ralstonia eutropha H16 (63.2%)
Burkholderia cenocep. PC184 (52.9%)
Variovorax paradoxus S110 (48.6%)
Photorhabdus lum. TT01 (44.7%)
Proteus mirabilis HI4320 (41.8%)
Escherichia coli SMS-3-5 (37.8%)



Γ

AtuGST7

Rhizobium legum. bv. WSM1325 (65%)
Bradyrhizobium sp. BTAi1 (59.7%)
Bordetella pertussis Tohama I (48.6%)
Methylobacterium chlorom. CM4 (40.8%)
Myxococcus xanthus DK 1622 (35.5%)
Burkholderia xenovorans LB400 (30.5%)



Δ

AtuGST8

A. radiobacter K84 (64.8%)
S. meliloti 1021 (60.8%)
Rhizobium etli IE4771 (56.2%)
Polaromonas sp. JS666 (40.6%)
Stigmatella aur. DW4/3-1 (35.6%)
Pseudomonas aer PA7 (32.1%)



ΣΧΗΜΑ 3.6. Διαγραμματική απεικόνιση της ομοιότητας (σε ποσοστά %) κάθε ισοενζύμου GST (μπλε χρώμα) από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 με ομόλογες πρωτεΐνες από άλλα βακτήρια (γαλάζιο χρώμα). Το μήκος των αμινοξικών αλληλουχιών απεικονίζεται με μαύρες γραμμές. Η ανάλυση και η σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Geneious. Οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται οι αμινοξικές ακολουθίες καθώς και ο αριθμός καταχώρησης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων NCBI παρουσιάζονται παρακάτω: (Οργανισμός, αριθμός καταχώρισης στη NCBI) **A.** *AtuGST5: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK86108.1), *Rhizobium etli CFN 42* (ABC89131.1), *Sinorhizobium meliloti 1021* (CAC41764.1), *Candidatus Liberibacter asiaticus str. Psy62* (ACT57067.1), *Bartonella grahamii as4aup* (ACS51212.1), *Nitrobacter winogradskyi Nb-255* (ABA03432.1), *Wolbachia endosymbiont of Onchocerca volvulus* (CAL29431), **B.** *AtuGST6: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAD43999.1), *Ralstonia eutropha H16* (CAJ95248.1), *Burkholderia cenocepacia PC184* (EAY65698.1), *Variovorax paradoxus S110* (ACS16705.1), *Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii TT01* (CAE14968.1), *Proteus mirabilis HI4320* (PI5214.2), *Escherichia coli SMS-3-5* (ECSMS35_4706), **Γ.** *AtuGST7: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK86642.2), *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325* (ACS55200.1), *Bradyrhizobium sp. BTai1* (ABQ34500.1), *Bordetella pertussis Tohama I* (CAE41951.1), *Methylobacterium chloromethanicum CM4* (ACK86112.1), *Myxococcus xanthus DK 1622* (ABF87712.1), *Burkholderia xenovorans LB400* (ABE37052.1), **Δ.** *AtuGST8: Agrobacterium tumefaciens str. C58* (AAK86643.1), *Agrobacterium radiobacter K84* (ACM25824.1), *Sinorhizobium meliloti 1021* (CAC45530.1), *Rhizobium etli IE4771* (ZP_03517044.1), *Polaromonas sp. JS666* (ABE43945.1), *Stigmatella aurantiaca DW4/3-1* (EAU63748.1), *Pseudomonas aeruginosa PA7* (ABR81284.1).

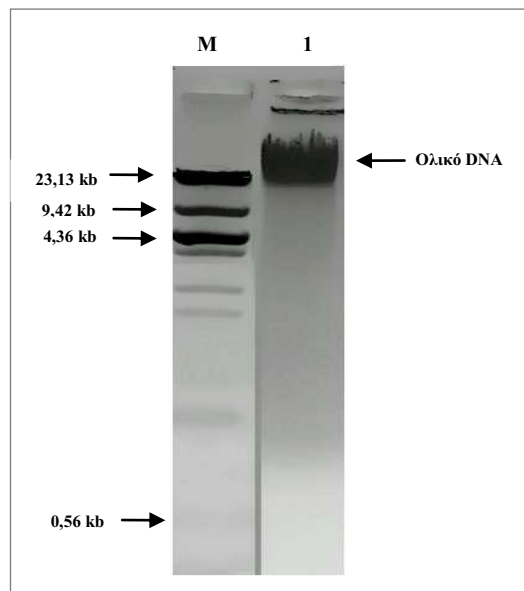
Σε γενικές γραμμές, για την πλειοψηφία των ισοενζύμων, παρατηρείται συγγένεια με το γνωστά γένη ριζόβιων αζωτοβακτηρίων *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης των ισοενζύμων με ομόλογες πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς έδειξε ότι ένα μονό ισοένζυμο από αυτά που μελετηθήκαν, το *AtuGST5* παρουσιάζει ποσοστό μέγιστης ταυτοσημίας που ξεπερνά το 80% με ομόλογη του πρωτεΐνη από το στέλεχος *Rhizobium etli CFN 42* (ποσοστό ταυτοσημίας 80,4%). Για τα υπόλοιπα ισοένζυμα οι ομόλογες πρωτεΐνες που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά ταυτοσημίας παρουσιάζουν σαφώς χαμηλότερο βαθμό ομοιότητας που κυμαίνεται από 60 έως 68%.

3.3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* C58.

Η απομόνωση του ολικού DNA του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* C58 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.1. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας το προϊόν αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 0,5% (w/v), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.7. Στη θέση 1 διακρίνεται η ζώνη που αντιστοιχεί στο ολικό DNA του βακτηρίου. Πρέπει να διευκρινιστεί, ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K\tau$$

όπου μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα και $K\tau$ ο συντελεστής καθυστέρησης ο οποίος σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των κινουμένων μορίων. Συνεπώς, είναι δικαιολογημένη η μη αναλογική σχέση μεγέθους του απομονωμένου DNA με τους μάρτυρες μοριακού μεγέθους που χρησιμοποιήθηκαν καθώς η κινητικότητα του γενετικού υλικού που απομονώθηκε δεν εξαρτάται μονό από το μέγεθος αλλά και στερεοδομή των μορίων DNA (γραμμικά και κυκλικά, υπερελικωμένα ή μη μόρια DNA).



ΣΧΗΜΑ 3.7. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζη 0,5% (w/v) του ολικού DNA (θέση 1) από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58. Ως μάρτυρας (M) χρησιμοποιήθηκε ο λDNA κατόπιν πέψης με HindIII. Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.

3.3.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΑ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ GSTs ΑΠΟ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟ DNA.

Χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) με εκμαγείο το ολικό DNA που απομονώθηκε από το *Agrobacterium tumefaciens*. Η μέθοδος αυτή συνίσταται σε εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA, το οποίο ορίζεται από δύο εκκινητές για το 5' και το 3' άκρο, με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8*. Στην τελευταία στήλη αναφέρεται το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος για κάθε γονίδιο μετά τις αντιδράσεις PCR.

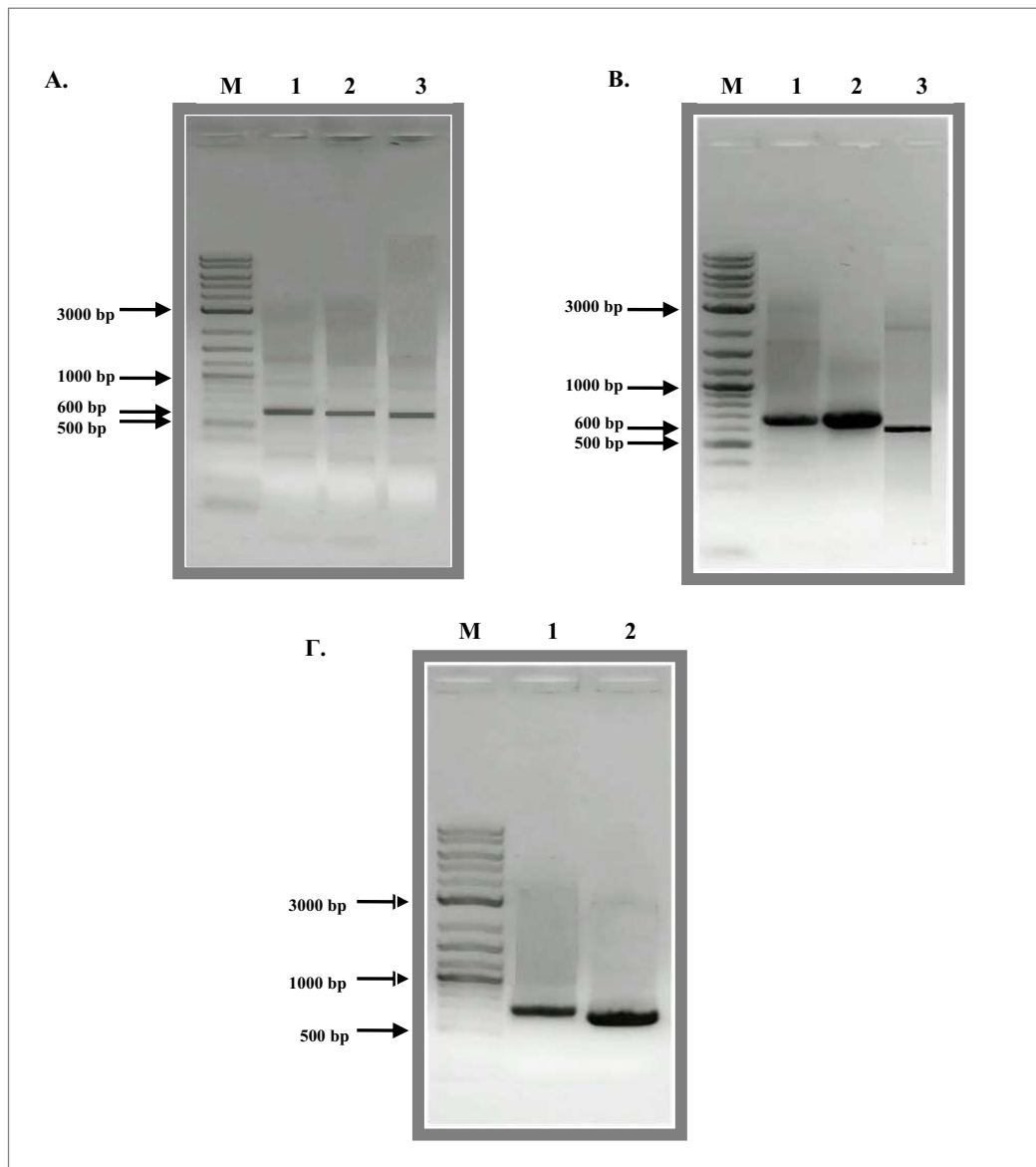
Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST1</i>)	<i>AtuGST1F</i>	ATGAGTGAATTGATCTTTTATAACC	627
	<i>AtuGST1R</i>	TTATCCAGCCGCCTGCAACTCCTTGG	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST2</i>)	<i>AtuGST2F</i>	ATGCTAACGCTCTTTTCACGCCCC	612
	<i>AtuGST2R</i>	TCAAGCCGCAACCACGGTGCAGG	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST3</i>)	<i>AtuGST3F</i>	ATGGAAGTCTTTATTCGCCCCGCTC	597
	<i>AtuGST3R</i>	CTAGGCGGCGGCTTTCATTCCGC	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST4</i>)	<i>AtuGST4F</i>	ATGTCAAATATCGAAACAGTCCCC	693
	<i>AtuGST4R</i>	TCAGTCTTTGAGGCCGCGGTGAAG	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST5</i>)	<i>AtuGST5F</i>	ATGCCAACTCTCTATCACTCCCCG	693
	<i>AtuGST5R</i>	TCAGAAATCCAGATCGGCGTAGTGG	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST6</i>)	<i>AtuGST6F</i>	ATGAAACTCTACTACATGCCCCCG	636
	<i>AtuGST6R</i>	TCAGCTCAGCGATAAGCCTTCTTC	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>AtuGST7</i>)	<i>AtuGST7F</i>	ATGATGGCTATCCCATGGCCCGCGGC	705

	<i>AtuGST7R</i>	TCA GCC TCT CTC CCC CTC CAG CGC	
Agrobacterium tumefaciens (<i>AtuGST8</i>)	<i>AtuGST8F</i>	ATGTTGACGATTTACGGTGTGTACCG	660
	<i>AtuGST8R</i>	TTACGCTGCCTCGGCCGTCCGGCTG	

Οι συνθήκες για κάθε αντίδραση PCR, καθορίστηκαν μετά από επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις, στις οποίες μελετήθηκαν οι σημαντικότερες μεταβλητές της αντίδρασης (Πίνακας 3.2). Οι τελικές συνθήκες είναι οι ακόλουθες: η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης και περιέχει σε συνολικό όγκο 50 μL τα παρακάτω αντιδραστήρια: 1 μL MgCl_2 (25 mM), 0,2 mM από καθένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTPs), 1 U Taq DNA πολυμεράσης (Promega, U.K.), 8 pmol από τον κάθε εκκινητή (Πίνακας 3.2) και 5 ng DNA ως μήτρα. Η πρόσδεση των εκκινητών γίνεται σε θερμοκρασία περίπου 5°C πιο χαμηλά από τις θερμοκρασίες τήξης (T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 3.3). Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR είναι το ακόλουθο: η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 94 °C για 5 min. Ακολούθησαν 35 κύκλοι του 1 min στους 94 °C, 1 min στην επιθυμητή κάθε φορά θερμοκρασία η οποία καθορίζεται από το T_m των εκκινητών όπως αναφέρθηκε παραπάνω και 2 min στους 72 °C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 10 min. Ως μάρτυρας πραγματοποιήθηκε όμοια PCR αντίδραση χωρίς την παρουσία εκκινητών. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) (Σχήμα 3.8) και γίνονται ορατά σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

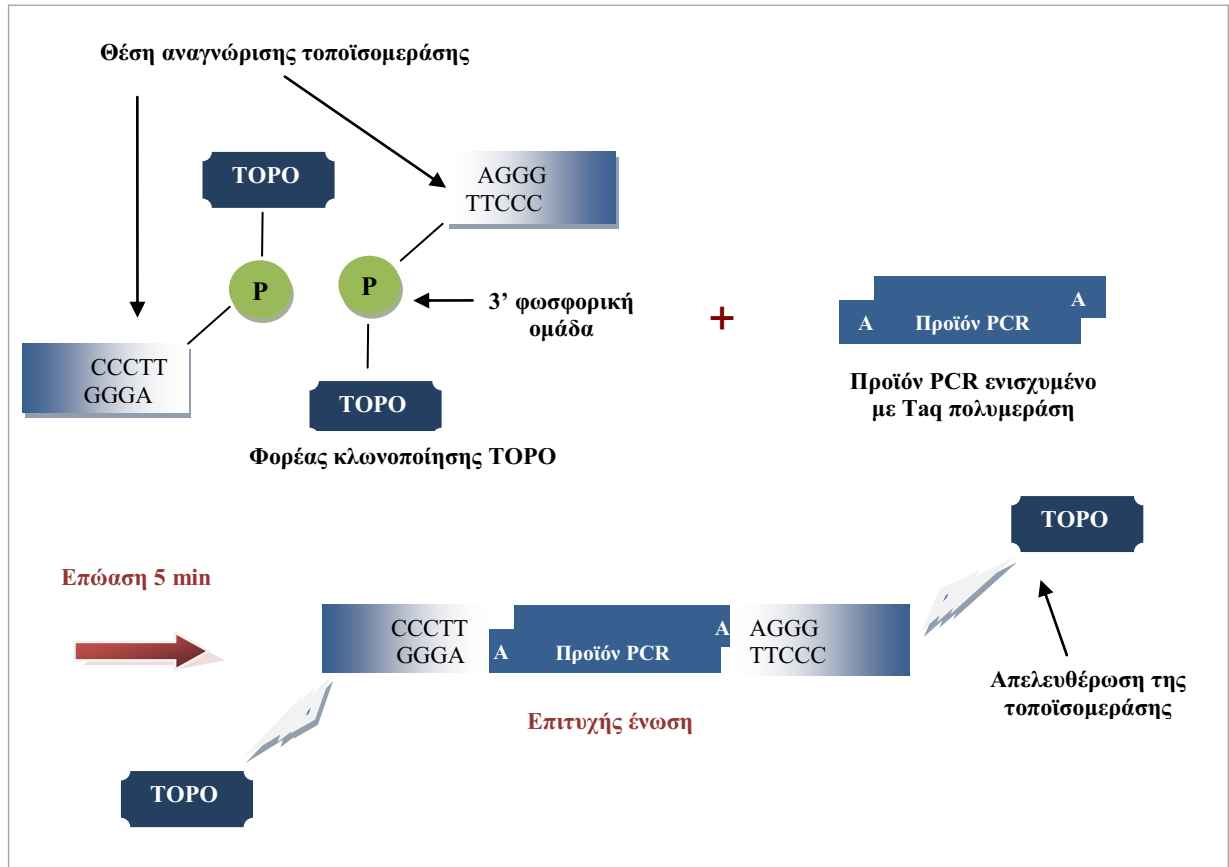
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3. Παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών των γονιδίων *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8* που εφαρμοσθήκαν στις αντιδράσεις PCR.

Γονίδιο	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)
<i>AtuGST1</i>	42
<i>AtuGST2</i>	45
<i>AtuGST3</i>	48
<i>AtuGST4</i>	50
<i>AtuGST5</i>	52
<i>AtuGST6</i>	55
<i>AtuGST7</i>	58
<i>AtuGST8</i>	60



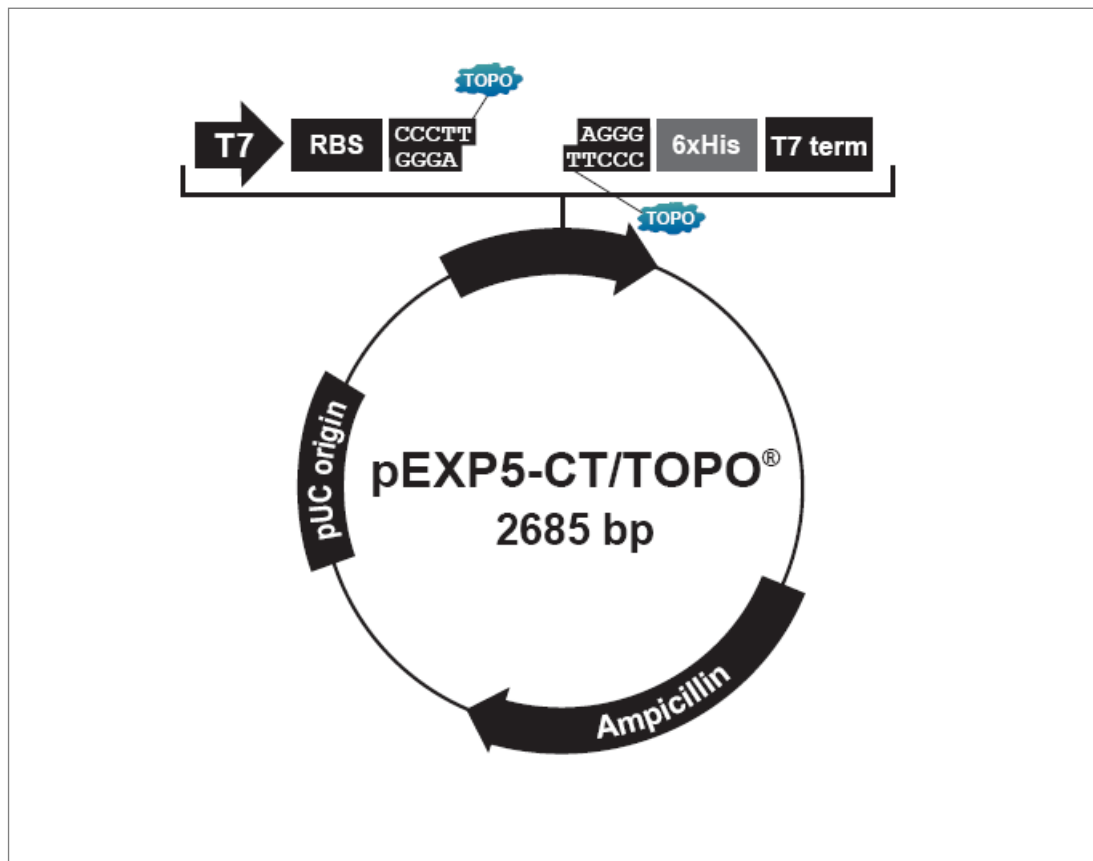
ΣΧΗΜΑ 3.8. Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% (w/v) των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων: **A).** Θέσεις 1, 2, 3: *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, **B).** Θέσεις 1,2,3: *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, **Γ).** Θέσεις 1, 2: *AtuGST7* και *AtuGST8* Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-log DNA marker (M). Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε bp.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] (Σχήμα 3.10) και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων TOP10 με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του TOPO Cloning.



ΣΧΗΜΑ 3.9. Σχηματική αναπαράσταση της TOPO κλωνοποίησης.

Η κλωνοποίηση TOPO (Σχήμα 3.9) εκμεταλλεύεται την ικανότητα πρόσδεσης της τοποϊσομεράσης I του ιού *Vaccinia* σε δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένη θέση. Η Taq πολυμεράση έχει δραστηριότητα τελικής μεταφοράσης ανεξαρτήτως ακολουθίας, η οποία προσθέτει δεοξυαδενοσίνη (A) στο 3' άκρο του προϊόντος της PCR. Ο «ενεργοποιημένος» πλασμιδιακός ευθύγραμμος φορέας φέρει προεξέχοντα 3' κατάλοιπα δεοξυθυμιδίνης (T), γεγονός που επιτρέπει στα PCR ένθετα να προσδένονται αποτελεσματικά με το φορέα. Η ένωση του φορέα με ένα προϊόν PCR που πρέπει να διαθέτει προεξέχοντα άκρα 3'-A, συμβαίνει αυθόρμητα σε χρονική διάρκεια 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ένωση, το πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυτταρών. Το αρχικό στάδιο της προσθήκης καταλοίπων αδενίνης (A) στο 3'-άκρο του PCR προϊόντος, στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν πραγματοποιήθηκε καθόσον το προϊόν PCR παρήχθη με Taq DNA πολυμεράση.



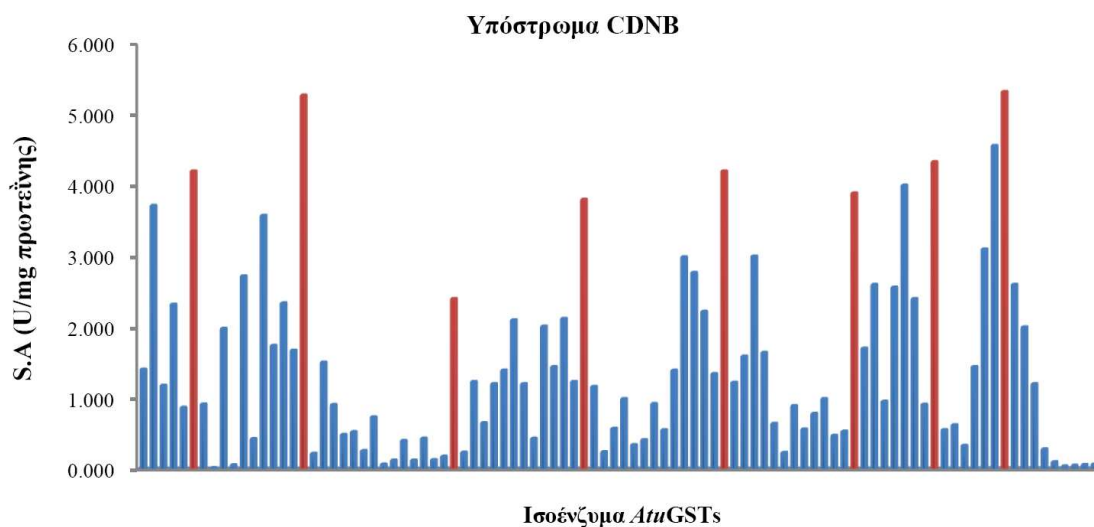
ΣΧΗΜΑ 3.10. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] του οποίου τα χαρακτηριστικά παραθέτονται παρακάτω. Όπου **T7** είναι ο προαγωγέας του βακτηριοφάγου T7, **lacO** είναι ο χειριστής του οπερονίου της λακτόζης, **RBS** είναι η ριβοσωμική θέση δέσμευσης, **TOPO[®] cloning site** είναι η θέση εισαγωγής του PCR προϊόντος, **6xHis** είναι η περιοχή που κωδικοποιεί για έξι ιστιδίνες οι οποίες επιτρέπουν τον καθαρισμό του γονιδίου μέσω στήλης Ni-NTA, **T7 term** είναι η μεταγραφική τελική περιοχή του βακτηριοφάγου T7, **Ampicillin** είναι το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και **pUC origin** είναι η αρχή αντιγραφής.

Η τοποϊσομεράση I καταλύει τη χαλάρωση αρνητικά υπερελικωμένου DNA. Για τη δράση του ενζύμου δεν απαιτείται ενέργεια (ATP) είναι θερμοδυναμικά επιτρεπτή. Στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται ένα μόριο τυροσίνης (Tyr), η ελεύθερη υδροξύλ-ομάδα του αμινοξέος κάνει μία πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα φωσφορικό μόριο της μίας αλυσίδας, στο σημείο αυτό σπάει ο φωσφοδιεστερικός δεσμός και οι αλυσίδες που πλέον είναι ελεύθερες χαλαρώνουν. Το ένζυμο παραμένει ομοιοπολικά δεσμευμένο στο 5' άκρο του "σπασμένου" κλώνου. Όταν η ενέργεια του φωσφοδιεστερικού δεσμού αναπληρωθεί η ελεύθερη υδροξύλ-ομάδα στο 3' άκρο του "σπασμένου" κλώνου αντιδρά με το φωσφορικό μόριο προς αποκατάσταση του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Με σκοπό την ετερόλογη έκφραση και τον έλεγχο ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Παράγραφος 2.4.3) από 12 τυχαίους κλώνους που επιλεχθήκαν για κάθε ισοένζυμο και ακολούθησε μετασχηματισμός των πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) (Παράγραφος 2.4.2).

3.3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs.

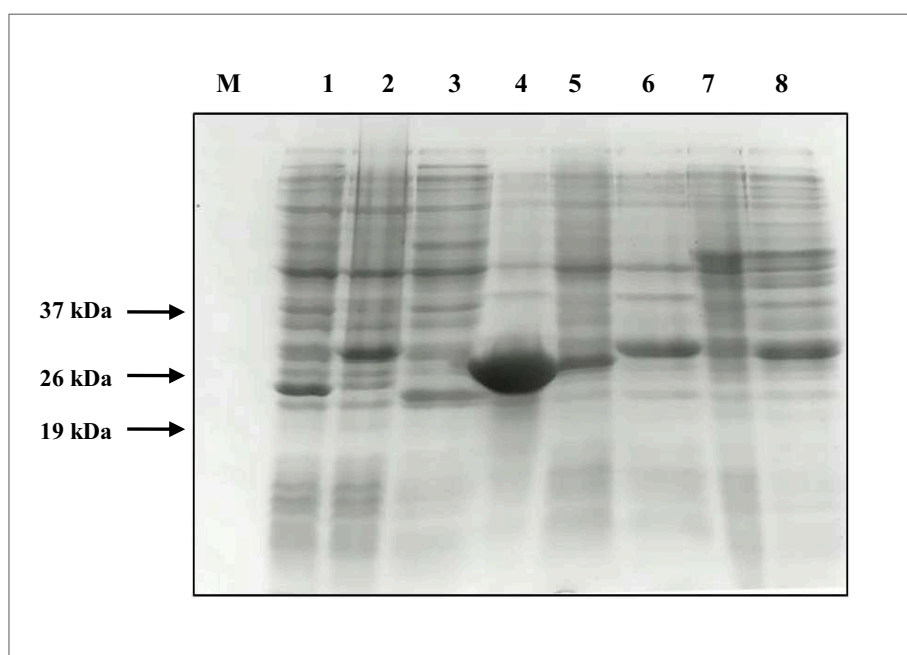
Οι GSTs που προέκυψαν (συνολικά 96 κλώνοι: 12 κλώνοι για κάθε ένα από τα 8 ισοένζυμα) χρησιμοποιήθηκαν για μικρής κλίμακας ετερόλογη έκφραση. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση και ακολούθησε λύση των βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων. Τα ενζυμικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο της δραστηριότητας της βιβλιοθήκης των GST ενζύμων που προέκυψε ως προς το υπόστρωμα CDNB (Παράγραφος 2.4.19.1) και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεΐνης (Παράγραφος 2.4.10). Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων ως προς το υπόστρωμα CDNB.



ΣΧΗΜΑ 3.11. Σχηματική απεικόνιση της ειδικής δραστηριότητας (S.A., U/mg πρωτεΐνης) των ισοενζύμων GST από το βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* C58 έναντι του υποστρώματος CDNB. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια επιλεχθήκαν οι κλώνοι που παρουσίασαν συγκριτικά αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα (Σχήμα 3.11., κόκκινοι ράβδοι). Επιπλέον, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης των επιλεγμένων ενζύμων και εκτιμήθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες με-

τουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) (Σχήμα 3.12). Μετά από την απομόνωση των πλασμιδίων τους με τη βοήθεια του QIAquick™ Mini Prep Kit, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση (MWG-Biotech AG, Γερμανία) χρησιμοποιώντας ως εκκινήτη τον T7-forward. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε η μετάφραση των γονιδίων μέσω του προγράμματος Translate (<http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>) και ταυτοποίηση του σωστού αναγνωστικού πλαισίου. Επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω ένα ισοένζυμο (*AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, *AtuGST8*) από κάθε μία από τις 8 σειρες ισοενζύμων.



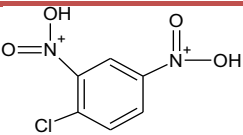
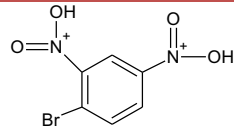
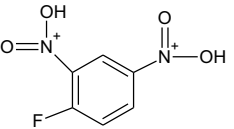
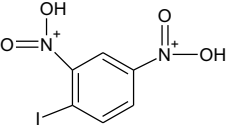
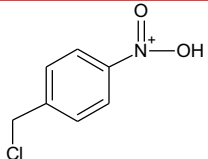
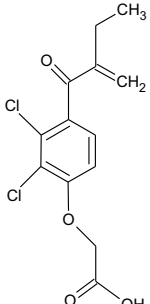
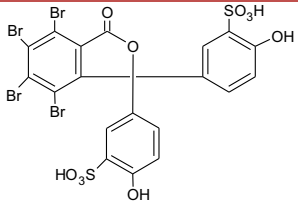
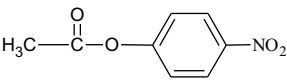
ΣΧΗΜΑ 3.12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. Παρουσιάζονται τα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα των 8 κλώνων που Επιλεχθήκαν για περαιτέρω ανάλυση. θέση 1: *AtuGST1*, θέση 2: *AtuGST2*, θέση 3: *AtuGST3*, θέση 4: *AtuGST4*, θέση 5: *AtuGST5*, θέση 6: *AtuGST6*, θέση 7: *AtuGST7*, θέση 8: *AtuGST8*. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε kDa.

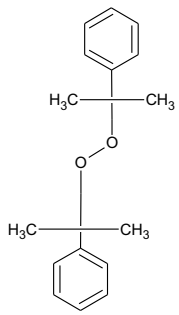
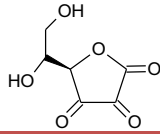
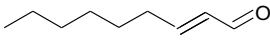
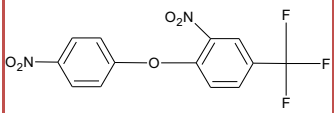
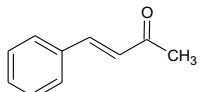
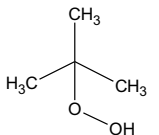
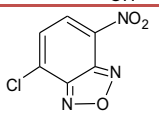
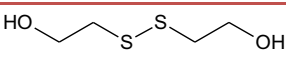
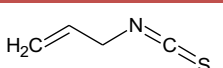
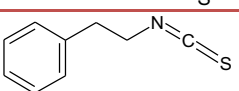
3.3.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΓΙΑ ΕΝΑ ΕΥΡΥ ΦΑΣΜΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.

Οι ανασυνδυασμένες *AtuGSTs* μελετήθηκαν ως προς την καταλυτική τους δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μεγάλο εύρος υποστρωμάτων (Πίνακας 3.4). Η μεθοδολογία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας για κάθε υπόστρωμα περιγράφονται στις παραγράφους 2.4.19.1. (για τα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), 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)), 2.4.19.2. (για τα υδροϋπεροξειδίου του κουμηνίου (CuOOH) και τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (t-BuOOH)), 2.4.19.3. (για τη 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED)), 2.4.19.4. (για το διυδροασκορβικό οξύ (DHA)), 2.4.19.5. (για τα αιθακρυνικό οξύ (EA) και trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη), 2.4.19.6. (για τα βρωμοσουλφοφθαλεΐνη (BSP) και trans-2-ενενάλη (HNE)), 2.4.19.7. (για τα ισοθειοκυανικός φαινυλαιθυλ-εστέρας και ισοθειοκυανικός αλλυλ-εστέρας), 2.4.19.8. (για την οξική p-νιτροφαινόλη (p-NPA) και 2.4.19.9. (για το fluorodifen).

Η πλειοψηφία των ενζύμων εμφανίζουν παρόμοια δραστηριότητα ως προς τα αρωματικά αλογονοπαράγωγα, CDNB, BDNB, FDNB, IDNB και p-NBC με χαμηλότερη δραστηριότητα έναντι του IDNB (ιωδοπαράγωγο). Όσον αφορά τα ισοθειοκυανικά φαίνεται να μην αποτελούν καλά υποστρώματα για τα υπό μελέτη ισοένζυμα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στη δομή των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων και στον ισχυρό υψηλής ενέργειας δεσμό του CN που δύσκολα διασπάται για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο υποστρώματος-γλουταθειόνης. Το ένζυμο *AtuGST6* εμφανίζει εξαπλάσια δραστηριότητα ως προς το p-NPA συγκριτικά με το πρότυπο υπόστρωμα CDNB γεγονός που υποδηλώνει πιθανότατα ενζυμική δράση εστεράσης. Τα πιο εντυπωσιακά και αξιοσημείωτα αποτελέσματα αφορούν την πρωτεΐνη *AtuGST4*. Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα και πρωτότυπη συμπεριφορά από άποψη ενζυμικής δραστηριότητας καθώς εμφανίζει αυξημένη δράση υπεροξειδάσης, δεδομένου ότι τα υπεροξειδία φαίνεται να είναι άριστα υποστρώματα του συγκεκριμένου ενζύμου, αλλά και σημαντική δραστηριότητα ως προς το βασικό υπόστρωμα των GSTs, το CDNB. Αξίζει να αναφερθεί ότι εμφανίζει σχεδόν 24-φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα ως προς το υδροϋπεροξειδίου CuOOH συγκριτικά με το σύνολο των ισοενζύμων. Για τον λόγοις αυτούς ο κλώνος *AtuGST4* επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4. Ειδικές δραστηριότητες (U/mg) των *AtuGSTs* έναντι επιλεγμένων υποστρωμάτων. Οι ενζυμικοί προσδιορισμοί για κάθε υπόστρωμα περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Υπόστρωμα	Δομή	<i>AtuGST1</i>	<i>AtuGST2</i>	<i>AtuGST3</i>	<i>AtuGST4</i>	<i>AtuGST5</i>	<i>AtuGST6</i>	<i>AtuGST7</i>	<i>AtuGST8</i>
1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)		0,010	0,004	0,010	0,028	0,006	0,002	0,016	0,002
1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB)		0,025	0,011	0,028	0,057	0,012	0,009	0,033	0,032
1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB)		0,045	0,009	0,027	0,238	0,010	0,006	0,024	0,007
1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB)		0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001
π-νιτροβενζύλ-χλωρίδιο (PNBC)		0,020	0,002	0,009	0,015	0,001	0,003	0,002	0,003
Εθακρυνικό οξύ		0,002	0,003	0,004	1,429	0,011	0,004	0,003	0,009
Βρομοσουλφοφθαλαινίλη		0,0003	0,0003	0,0006	0,002	0,0003	0,0006	0,0003	0,001
Οξική p-νιτροφαινόλη		0,004	0,003	0,003	0,002	0,004	0,011	0,007	0,006

Υδροπυροξείδιο του κουμηνίου (CuOOH)		0,037	1,100	0,039	4,249	0,002	0,025	0,018	0,016
Διυδροασκορβικό οξύ (DHA)		0,0006	0,077	0,071	0,002	0,002	0,029	0,042	0,034
trans-2-ενενάλη		0,0001	0,0004	0,0006	0,0002	0,0002	0,0003	0,0001	0,0003
Fluorodifen		0,008	0,057	0,066	0,013	0,011	0,006	0,009	0,011
trans-4-φαινύλ-3-βουτεν-2-όνη		0,0002	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0003	0,002	0,0001
τ-βουτυλο-υδροπυροξείδιο (t-BuOOH)		0,012	0,011	0,036	0,080	0,035	0,005	0,013	0,019
4-νιτροβενζο φουραζάνιο		0,008	0,002	0,002	0,003	0,006	0,005	0,0004	0,003
2-υδροξυεθύλ-δισουλφίδιο (2,2 διθειοδιαιθανόλη)		0,183	0,011	0,018	0,018	0,146	0,091	0,142	0,128
Ισοθειοκυανικός αλλύλ-εστέρας		0,0002	0,0002	0,004	0,0007	0,001	0,0002	0,0002	0,0003
Ισοθειοκυανικός φαινύλαιθυλ-εστέρας		0,003	0,0003	0,0003	0,0006	0,002	0,0006	0,001	0,0008

3.3.6. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Η πρωτεΐνη *AtuGST4* η οποία προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 μελετήθηκε φυλογενετικά. Η φυλογενετική ανάλυση περιλαμβάνει την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου και την εύρεση φυλογενετικών συσχετίσεων. Πρακτικά αυτό που γίνεται είναι η διατύπωση μιας υπόθεσης για μια εξελικτική διαδικασία που έγινε στο παρελθόν, εκμεταλλευόμενοι ένα πολύ μικρό ποσοστό πληροφορίας που εμπεριέχεται στο σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιούνται (Swofford et al., 1996). Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν πολλά φυλογενετικά δένδρα από τα οποία επιλέγουμε ένα ή περισσότερα,

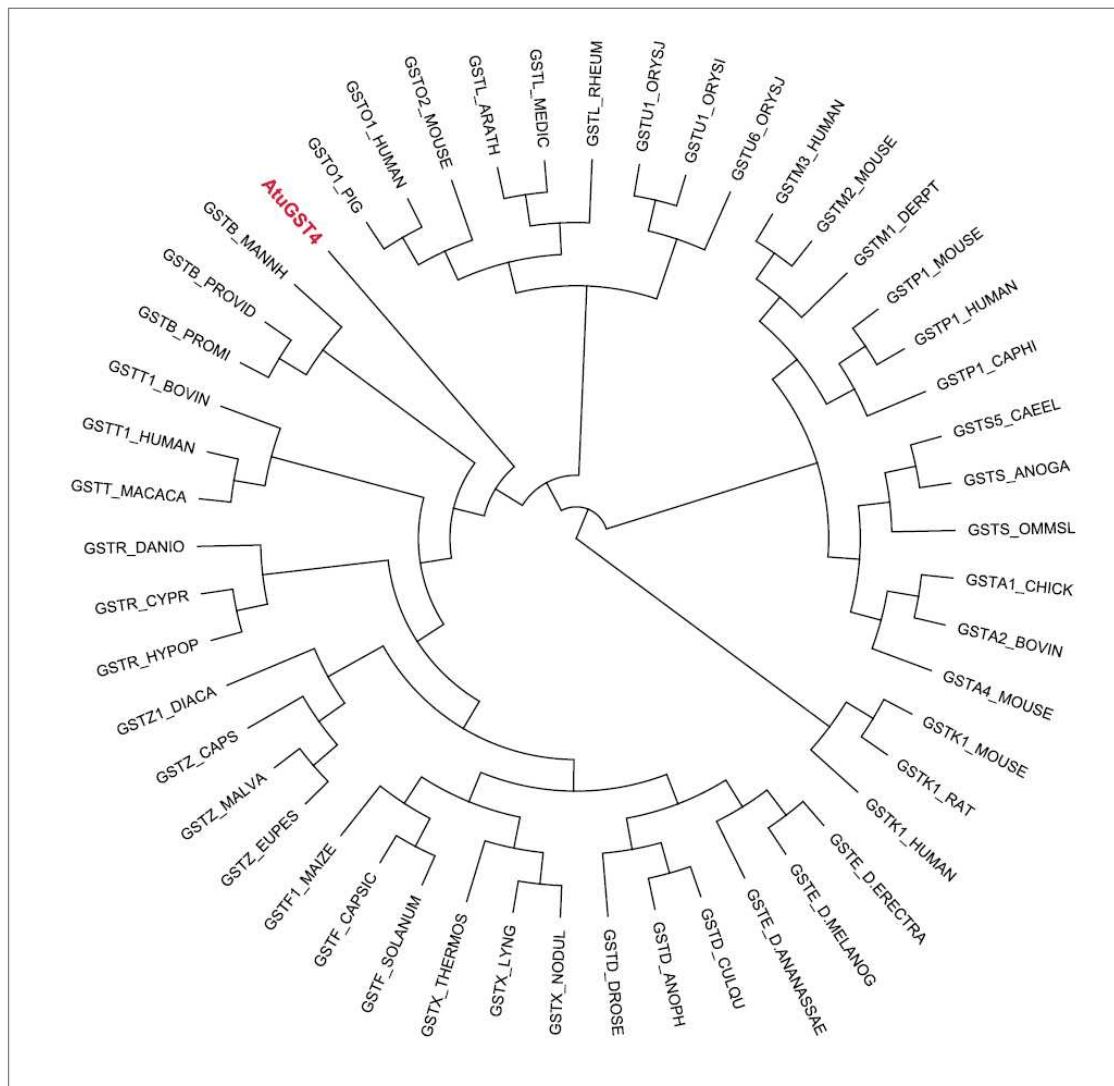
αλλά εξίσου ικανά να ερμηνεύσουν τις σχέσεις των ακολουθιών που μελετώνται. Οι εξελικτικές σχέσεις αναπαρίστανται ως κλαδιά των οποίων το μήκος και ο βαθμός εμφωλιασμού δηλώνουν τη σχέση. Οι ακολουθίες τοποθετούνται στο χαμηλότερο επίπεδο του δέντρου (taxa), ενώ οι εσωτερικοί κόμβοι απεικονίζουν το βαθμό συσχέτισης των ακολουθιών. Όπως είναι αναμενόμενο, δύο σχετιζόμενες ακολουθίες θα βρίσκονται σε κοντινά κλαδιά. Τα φυλογενετικά δέντρα αναπαρίστανται κυρίως με δυο τρόπους και διακρίνονται σε αυτά με ρίζα (rooted trees) στα οποία υπάρχει κοινός πρόγονος για όλες τις ακολουθίες (OTUs: Operational Taxonomic Units) και στα οποία το μονοπάτι από τη ρίζα σε κόμβο προσδιορίζει το εξελικτικό μονοπάτι, και σε αυτά χωρίς ρίζα (unrooted trees) τα οποία προσδιορίζουν σχέση αλλά όχι το εξελικτικό μονοπάτι.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι κατασκευής και ανάλυσης φυλογενετικών δέντρων. Με βάση τον κύριο διαχωρισμό τους αναφέρονται ως: (α) μέθοδοι που βασίζονται στις αποστάσεις και (β) ως διακριτές μέθοδοι [μέθοδος μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) (Page&Holmes, 1998)]. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τις ακολουθίες που συγκρίνονται.

Στη συγκεκριμένη μελέτη κατασκευαστήκαν τρεις τύποι φυλογενετικών δένδρων εφαρμόζοντας την προσέγγιση βάσει απόστασης με σκοπό την ανάλυση του ενζύμου *AtuGST4*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) και UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Sneath & Sokal, 1973) επειδή οι ακολουθίες που συγκρίνονται εμφανίζουν αναγνωρίσιμη ομοιότητα. Ουσιαστικά, πραγματοποιήθηκε μία ιεραρχική ομαδοποίηση όπου οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίζονται για όλες τις ακολουθίες (OTUs), και τα μήκη των κλαδιών του δένδρου αντιστοιχούν σε αυτές τις αποστάσεις. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η αξιοπιστία στην τοπολογία των κλάδων ενός δέντρου είναι η bootstrap ανάλυση (Brown & Newey, 2002). Με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW (Thompson et al., 1994) πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών, ενώ χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο Phylip (Felsenstein, 1989) για ανάλυση αποστάσεων. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού προγράμματος ProDIST (Phylip 3.6) (Felsenstein, 2001) υπολογίστηκαν οι αποστάσεις μεταξύ ακολουθιών βάσει του μοντέλου Dayhoff (πίνακες PAM) (Dayhoff et al. 1978).

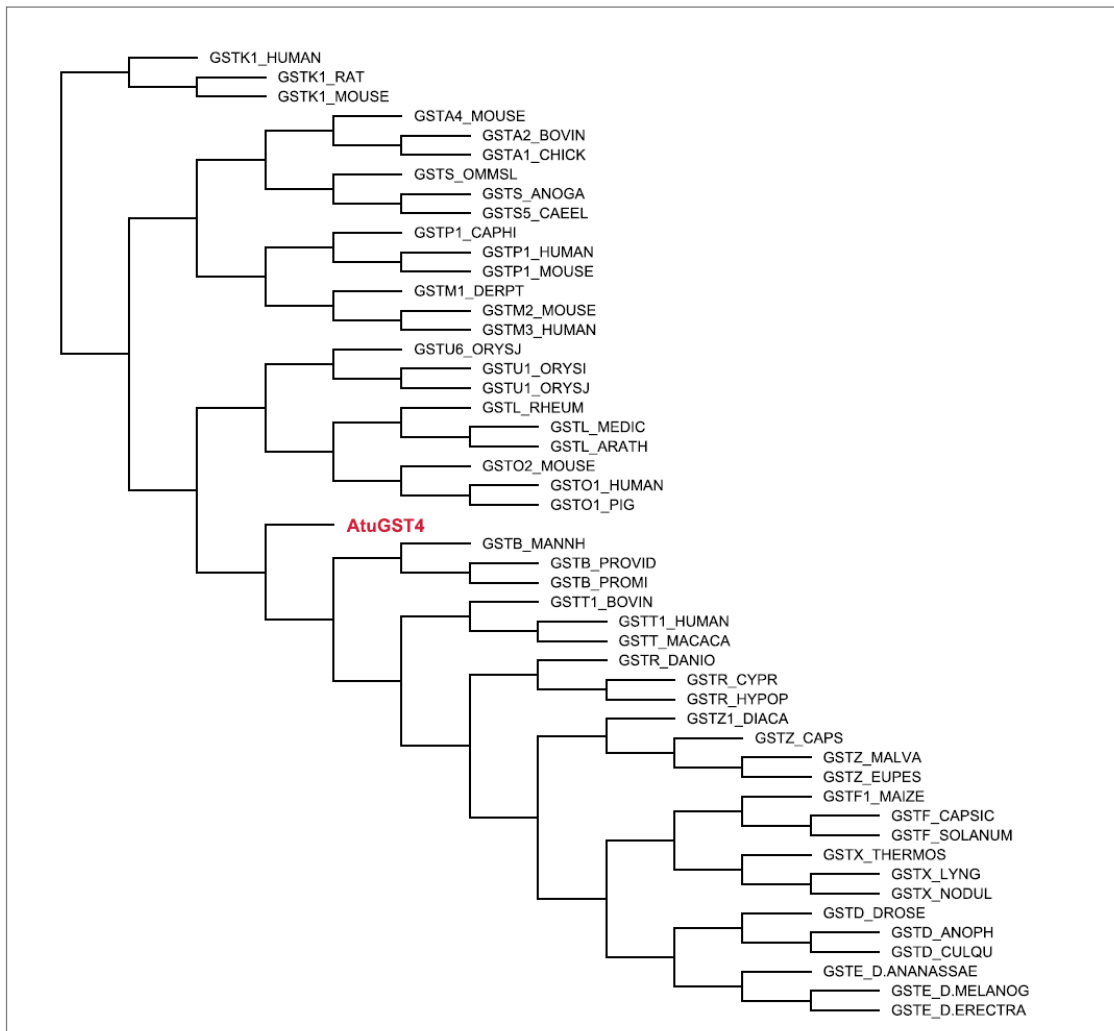
Για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων εισήχθησαν αντιπρόσωποι από όλες τις γνωστές μέχρι σήμερα τάξεις της ομάδας ενζύμων των GST (συνολικά 16 τάξεις) οι οποίοι ανήκουν σε διαφορετικούς οργανισμούς και προέκυψε η φυλογενετική σχέση τους με το ένζυμο *AtuGST4*. Στα φυλογενετικά δένδρα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.12, 3.13., 3.14. φαίνεται καθαρά η ομαδοποίηση των διαφορετικών τάξεων των ενζύμων GST με μικρές δια-

φοροποιήσεις στους ακραίους κλάδους κάθε τάξης που οφείλονται στους διαφορετικούς οργανισμούς που έχουν επιλεγεί ως αντιπροσωπευτικοί. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 3.12, οι οργανισμοί που έχουν επιλεγεί να αντιπροσωπεύουν την τάξη άλφα (GSTA) των GST ανήκουν σε τρεις διαφορετικούς οργανισμούς: βοοειδές (GSTA2_BOVI), ποντίκι (GSTA4_MOUS) και κοτόπουλο (GSTA1_CHIC). Εντυπωσιακή είναι η διαφοροποίηση του ενζύμου *AtuGST4* (μπλε χρώμα) και στα τρία φυλογενετικά δένδρα καθώς διακρίνεται ο ξεχωριστός κλάδος στον οποίο φαίνεται να ανήκει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθώς και η εμφανής απόσταση της από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Πιθανότατα, το υπό μελέτη ένζυμο, εξαιτίας της φυλογενετικής απόκλισης που εμφανίζει, να μην ανήκει σε καμιά από τις μέχρι τώρα γνωστές οικογένειες των GST όπως επιβεβαιώνεται από το σύνολο των φυλογενετικών δένδρων.



ΣΧΗΜΑ 3.13. Φυλογενετικό δένδρο πολικής μορφής κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbour-Joining το οποίο παρουσιάζει τη φυλογενετική σχέση του ενζύμου *AtuGST49* με αντιπροσώπους από όλες τις

γνωστές τάξεις των GSTs. Τάξη → Συμβολισμός: $\alpha \rightarrow$ GSTA, $\beta \rightarrow$ GSTB, $\delta \rightarrow$ GSTD, $\varepsilon \rightarrow$ GSTE, $\kappa \rightarrow$ GSTK, $\theta \rightarrow$ GSTT, $\tau \rightarrow$ GSTU, $\rho \rightarrow$ GSTR, $\sigma \rightarrow$ GSTS, $\omega \rightarrow$ GSTO, $\chi \rightarrow$ GSTX, $\lambda \rightarrow$ GSTL, $\zeta \rightarrow$ GST, $\varphi \rightarrow$ GSTF, $\pi \rightarrow$ GSTP και $\mu \rightarrow$ GSTM. Οι ακολουθίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων με τους ακόλουθους κωδικούς: άλφα (Q08392 , O18879 , P24472), βήτα (P15214, D4C334, A7JQU5), δέλτα (B0W6B0, Q9GNE9, B4HHD9), έψιλον (B3NMR7, Q7KK90, B3MBB5), φι (A5YWI8, Q5DUH0, P12653), κάππα (Q9DCM2, P24473, Q9Y2Q3), λάμδα (B7FHT3, Q9LZ06, B5M1W3), μι (P21266, P15626, P46419), ωμέγα (Q9N1F5, P78417, Q8K2Q2), πι (P09211, Q9TTY8, P19157), ρο (A7XZW2, Q0GZP3, Q1L907), σίγμα (Q09596, P46088, P46428), θήτα (E2RD21 , P30711, Q2NL00), ταυ (Q10CE7, A2XMN2, Q06398), χι (A0ZF61, A0YYYY7, Q8DMB4), και ζήτα (P57108, Q84VH0, Q8H1P7, P28342). Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).



ΣΧΗΜΑ 3.14. Φυλογενετικό ορθογώνιας μορφής κατασκευασμένο με τη μέθοδο UPGMA το οποίο παρουσιάζει τη φυλογενετική σχέση του ενζύμου *AtuGST49* με αντιπροσώπους από όλες τις γνωστές τάξεις των GSTs. Τάξη → Συμβολισμός: $\alpha \rightarrow$ GSTA, $\beta \rightarrow$ GSTB, $\delta \rightarrow$ GSTD, $\varepsilon \rightarrow$ GSTE, $\kappa \rightarrow$

GSTK, $\theta \rightarrow$ GSTT, $\tau \rightarrow$ GSTU, $\rho \rightarrow$ GSTR, $\sigma \rightarrow$ GSTS, $\omega \rightarrow$ GSTO, $\chi \rightarrow$ GSTX, $\lambda \rightarrow$ GSTL, $\zeta \rightarrow$ GST, $\varphi \rightarrow$ GSTF, $\pi \rightarrow$ GSTP και $\mu \rightarrow$ GSTM. Οι ακολουθίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων με τους ακόλουθους κωδικούς: άλφα (Q08392 , O18879 , P24472), βήτα (P15214, D4C334, A7JQU5), δέλτα (B0W6B0, Q9GNE9, B4HHD9), έψιλον (B3NMR7, Q7KK90, B3MBB5), φι (A5YW18, Q5DUH0, P12653), κάππα (Q9DCM2, P24473, Q9Y2Q3), λάμδα (B7FHT3, Q9LZ06, B5M1W3), μι (P21266, P15626, P46419), ωμέγα (Q9N1F5, P78417, Q8K2Q2), πι (P09211, Q9TTY8, P19157), ρο (A7XZW2, Q0GZP3, Q1L907), σίγμα (Q09596, P46088, P46428), θήτα (E2RD21 , P30711, Q2NL00), ταυ (Q10CE7, A2XMN2, Q06398), χι (A0ZF61, A0YY7, Q8DMB4), και ζήτα (P57108, Q84VH0, Q8H1P7, P28342). Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).



ΣΧΗΜΑ 3.15. Φυλογενετικό ακτινικής μορφής κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbour-Joining το οποίο παρουσιάζει τη φυλογενετική σχέση του ενζύμου *AtuGST49* με αντιπροσώπους από όλες τις γνωστές τάξεις των GSTs. Τάξη → Συμβολισμός: $\alpha \rightarrow$ GSTA, $\beta \rightarrow$ GSTB, $\delta \rightarrow$ GSTD, $\varepsilon \rightarrow$ GSTE, $\kappa \rightarrow$ GSTK, $\theta \rightarrow$ GSTT, $\tau \rightarrow$ GSTU, $\rho \rightarrow$ GSTR, $\sigma \rightarrow$ GSTS, $\omega \rightarrow$ GSTO, $\chi \rightarrow$ GSTX, $\lambda \rightarrow$ GSTL, $\zeta \rightarrow$ GST, $\varphi \rightarrow$ GSTF, $\pi \rightarrow$ GSTP και $\mu \rightarrow$ GSTM. Οι ακολουθίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων με τους ακόλουθους κωδικούς: άλφα (Q08392, O18879, P24472), βήτα (P15214, D4C334, A7JQU5), δέλτα (B0W6B0, Q9GNE9, B4HHD9), έψιλον (B3NMR7, Q7KK90, B3MBB5), φι (A5YWI8, Q5DUH0, P12653), κάππα (Q9DCM2, P24473, Q9Y2Q3), λάμδα (B7FHT3, Q9LZ06, B5M1W3), μι (P21266, P15626, P46419), ωμέγα (Q9N1F5, P78417, Q8K2Q2), πι (P09211, Q9TTY8, P19157), ρο (A7XZW2, Q0GZP3, Q1L907), σίγμα (Q09596, P46088, P46428), θήτα (E2RD21, P30711, Q2NL00), ταυ (Q10CE7, A2XMN2, Q06398), χι (A0ZF61, A0YYY7, Q8DMB4), και ζήτα (P57108, Q84VH0, Q8H1P7, P28342). Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).

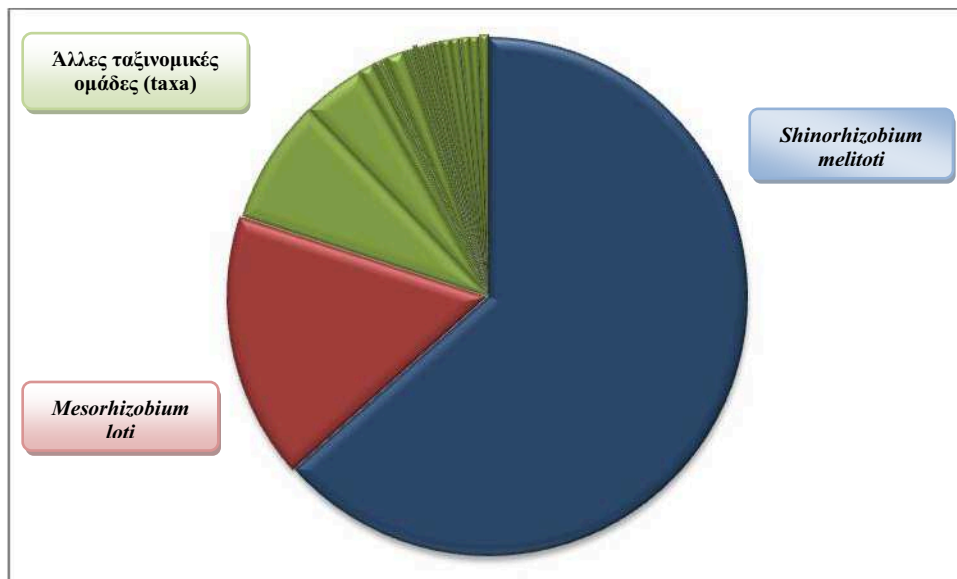
3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των GSTs έχουν σχετικά πρόσφατα μελετηθεί σε βακτήρια και επομένως ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με τις ιδιότητες τους. GSTs έχουν ανιχνευθεί σε βακτηριακά είδη όπως τα *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Serratia* (Di Ilio et al., & Federici 1988, Arca et al., 1990, Iizuka et al., 1989). Ένας αριθμός βακτηριακών GSTs εμφανίζουν υψηλές τιμές ειδικής δραστηριότητας ως προς εξειδικευμένα υποστρώματα και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η απαλογονάση του διχλωρομεθανίου (La Roche & Leisinger, 1990), η απαλογονάση της τετραχλωρουδροκινόνης (McCarthy et al., 1996) και μια αιθεράση (Masai et al., 1993).

Οι βακτηριακές GSTs εμφανίζουν περιορισμένη ενζυμική δραστηριότητα ως προς τα πρότυπα υποστρώματα της πλειοψηφίας των ένζυμων GSTs και συνεπώς η ύπαρξή τους σε βακτηριακούς οργανισμούς μέχρι πρόσφατα δεν θεωρούνταν σημαντική. Ωστόσο, η υποκυτταρική τους κατανομή και οι σχετικά υψηλές ειδικές δραστηριότητες έναντι ενός εύρους διαφορετικών υποστρωμάτων, υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες GSTs διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στους βακτηριακούς οργανισμούς.

Τα φωτοτροφικά βακτήρια, τα κυανοβακτήρια, τα πρωτεοβακτήρια (Faheyand & Sundquist, 1991) και μερικά α -πρωτεοβακτήρια (Newton et al., 1996) είναι τα μόνα γνωστά βακτήρια που περιέχουν γλουταθειόνη. Το *A. tumefaciens* είναι ένα α -πρωτεοβακτήριο το οποίο απα-

ντάται συχνά στο έδαφος και θεωρείται υπεύθυνο για την ασθένεια του κορονωτού κάλλου των φυτών, (Smith & Townsend, 1907), καθώς μολύνει περισσότερες από 90 οικογένειες δικοτυλήδων φυτών και συντελεί σε τεράστιες καταστροφές στον τομέα της αγροτικής παραγωγής (DeCleene et al., 1976). Παρ'αυτά, αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό και μοναδικό «όχημα» μεταφοράς γονιδίων, απαραίτητο εργαλείο έρευνας και κατασκευής διαγονιδιακών φυτών, αφού τα γονίδια του (Ti) πλασμιδίου του μπορούν να αντικατασταθούν από οποιαδήποτε νουκλεοτιδική ακολουθία. Η έρευνα και οι εμπορικές δυνατότητες του *A. tumefaciens* έχουν διευρυνθεί με την μεταφορά αυτών των γονιδίων (T-DNA) σε φυτικά είδη που αντιμετωπίζουν εγγενή δυσκολία αναπαραγωγής, σε μύκητες (de Groot et al., 1998) και ανθρώπινα κύτταρα (Kunik et al., 2001). Το *A. tumefaciens* ζει σε παρόμοιο περιβάλλον και μοιράζεται μια στενή εξελικτική σχέση με τα αζωτοβακτήρια του γένους *Rhizobiaceae* (Young et al., 2001). Το πρωτέωμα δυο αντιπροσώπων του συγκεκριμένου είδους των *Sinorhizobium meliloti* (Galibert et al., 2001) και *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000) φαίνεται να είναι περισσότερο παρόμοιο με αυτό του *A. tumefaciens* (Σχήμα 3.15).



ΣΧΗΜΑ 3.16. Σύγκριση του γονιδιώματος του *A. Tumefaciens* C58 με άλλα βακτηριακά γονιδιώματα. Κατανομή του συνόλου των πρωτεϊνών *A. Tumefaciens* C58 των οποίων η λειτουργία έχει χαρακτηριστεί με πρωτεΐνες όλων των δημοσιευμένων βακτηριακών γονιδιωμάτων (Wood et al., 2001).

Το βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* C58 περιέχει στο γονιδίωμα του ένα κυκλικό και ένα ευθύγραμμο χρωμόσωμα γεγονός ιδιαίτερα ασυνήθιστο αν λάβουμε υπόψιν το σύνολο των βακτηριακών γονιδιωμάτων που έχουν αποκωδικοποιηθεί. Η λεπτομερής ανάλυση του

γονιδιώματος του *A. tumefaciens* C58 φαίνεται στον Πίνακα 3.3 όπου παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του πλήρους γονιδιώματος του συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους.

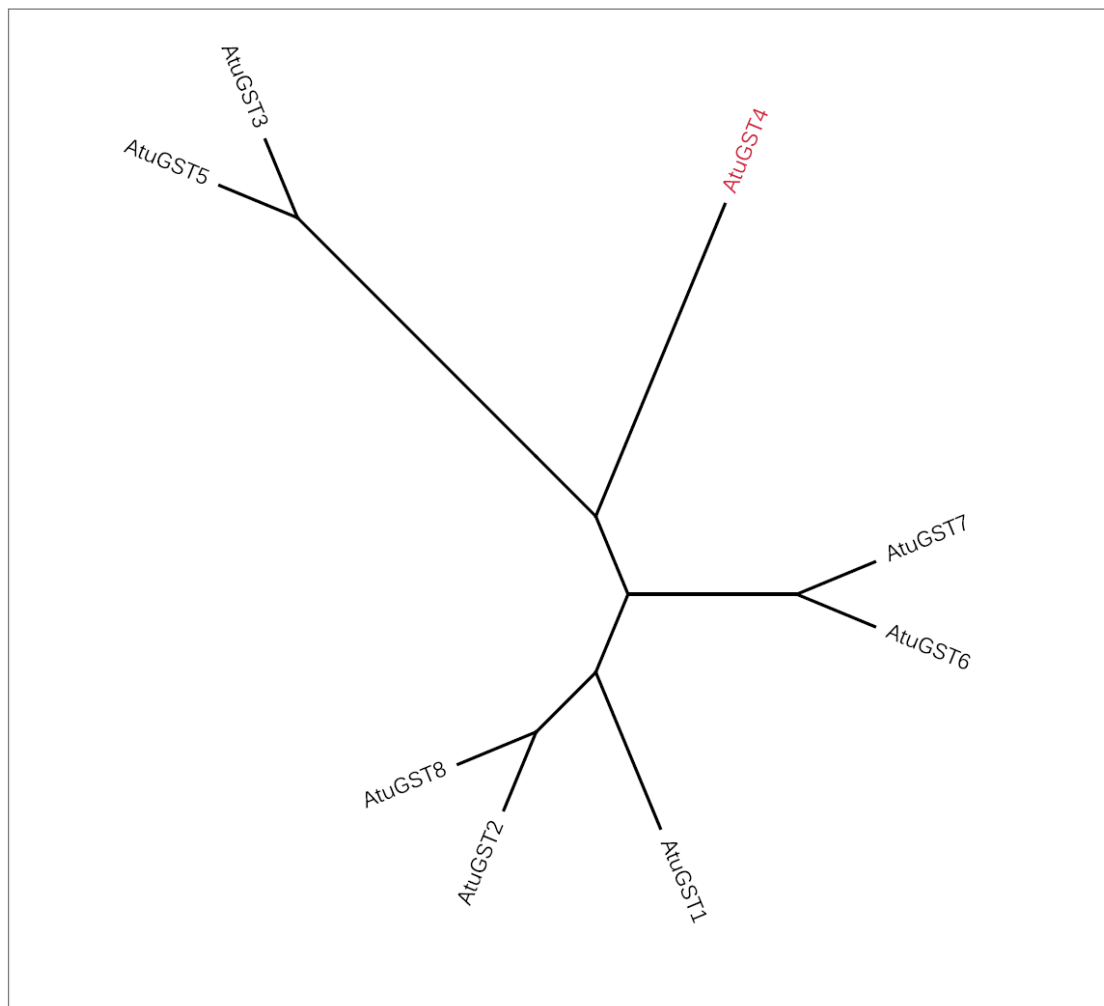
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5. Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του *A. tumefaciens* C58 (www.agrobacterium.org). Οι αλληλουχίες του γονιδιώματος του *A. tumefaciens* C58 έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων GenBank με αριθμούς καταχώρησης: κυκλικό χρωμόσωμα: AE008688, ευθύγραμμο χρωμόσωμα: AE008689, pAtC58: AE008687, pTiC58: AE008690.

Χαρακτηριστικό	Κυκλικό	Ευθύγραμμο	AtC58	TiC58	Σύνολο
	χρωμόσωμα	χρωμόσωμα			
Μέγεθος (bp)	2,841,490	2,075,560	542,779	214,233	5,674,062
Ποσοστό G+C	59,4	59,3	57,3	56,7	58,13
<i>Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες</i>					
Χαρακτηρισμένης λειτουργίας	1715	1286	333	141	3475 (64,1%)
Συντηρημένα υποθετικά	710	353	128	45	1237 (22,8%)
Υποθετικά	364	243	89	12	708 (13,1%)
Συνολικά	2789	1882	550	198	5419
Μέσο μέγεθος ORF (bp)	892	988	843	925	922
Κωδικοποιούσα περιοχή (%)	87,9	89,9	85,4	85,5	88,3
Ρυθμιστές (%)	7,7	10,4	11,8	5,1	9
ABC μεταφορέας	47	80	20	6	153

Το πρώτο βήμα της έρευνας αποτέλεσε η αναζήτηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν πιθανές GSTs στο βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* C58 στη ψηφιακή βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),. Η επιλογή 8 ισοενζύμων GST (5 πρωτεΐνες GST από το κυκλικό χρωμόσωμα του βακτηρίου, 2 πρωτεΐνες GST από το AT πλασμίδιο και 1 πρωτεΐνη GST από το ευθύγραμμο χρωμόσωμα), ακολουθήθηκε από κατακόρυφη στοίχιση των ακολουθιών τους με στόχο την επίτευξη μέγιστου επιπέδου ταυτοσημίας.

Τα ισοένζυμα GSTs από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58 εμφανίζουν ομοιότητα μεταξύ τους μόλις 18,8% γεγονός που δηλώνει την εξελικτική αποκλιση που παρουσιάζουν μεταξύ τους. Το φυλογενετικό δένδρο που σχεδιάστηκε (Σχήμα 3.16) απεικονίζει τη γενετική σχέση ανάμεσα στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες και πως αυτή εξελίχθηκε στο

πέρασμα του χρόνου. Πρέπει να επισημανθεί ότι εξαιτίας αυτής της μεγάλης απόκλισης μεταξύ των ακολουθιών τους, τα ένζυμα GSTs από βακτήρια, φυτά, θηλαστικά άλλα και από έντομα δεν είναι δυνατό να ομαδοποιηθούν συμφωνά με τα υπάρχοντα φυλογενετικά σύνολα. Αν μάλιστα λάβουμε υπόψη ότι η ταχύτητα της εξέλιξης ενός είδους είναι ανάλογη της γενετικής ποικιλομορφίας που παρουσιάζει, τότε είναι φανερό ότι η εξέλιξη των GSTs υπήρξε ταχύτερη μέχρι σήμερα. Αυτό πιθανότατα να αντανακλά την παράλληλη και ανεξάρτητη εξέλιξη των GST γονιδίων από αρχαιοτάτους προγονούς αν και η πιθανότητα της οριζόντιας μεταφοράς GST γονιδίων, εξειδικευμένων σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης, δεν θα πρέπει να αποκλείεται.



ΣΧΗΜΑ 3.17. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbour-Joining. Παρουσιάζεται η εξελικτική σχέση μεταξύ των ισοενζύμων GSTs *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, *AtuGST8* από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C58. Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις με το πρόγραμμα Seqboot του υπολογιστικού πακέτου PHYLIP (Felsenstein, 1989).

Σε δεύτερο επίπεδο πραγματοποιείται εύρεση ομόλογων πρωτεϊνών για τα ισοένζυμα των GST στο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul 1997) μέσω του δικτυακού τόπου National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών υποδεικνύει τον βαθμό ομοιότητας του κάθε ισοενζύμου με τις ομόλογες του πρωτεΐνες (Σχήματα 3.5, 3.6). Από τα αποτελέσματα της σύγκρισης του αλγορίθμου BLAST στη βάση δεδομένων παρατηρείται ότι για κάθε ισοένζυμο οι ομόλογες πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς που εμφανίζουν το μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας πετυχαίνουν αποτελέσματα (score) μικρότερα του 68%. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη μεγάλη εξελικτική απόκλιση που εμφανίζουν οι βακτηριακές GSTs σε σύγκριση με άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες.

Με σκοπό την απομόνωση και ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπό μελέτη GST πρωτεΐνες στο βακτηριακό στέλεχος *A. tumefaciens* C58 σχεδιάζονται οχτώ διαφορετικά ζεύγη εκκινήτων (Πίνακας 3.1), ένα για καθένα από τα ισοένζυμα *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7* και *AtuGST8*. Τα ζεύγη εκκινήτων (*AtuGST1F/AtuGST1R*, *AtuGST2F/AtuGST2R*, *AtuGST3F/AtuGST3R*, *AtuGST4F/AtuGST4R*, *AtuGST5F/AtuGST5R*, *AtuGST6F/AtuGST6R*, *AtuGST7F/AtuGST7R* και *AtuGST8F/AtuGST8R* όπου F πρόκειται για Forward εκκινήτη και R για Reverse), υβριδοποιούνται στα άκρα της αλληλουχίας των αντίστοιχων γονιδίων. Το μέγεθος των τμημάτων των ακολουθιών που ενισχύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1, ενώ ως εκμαγείο για τις PCR αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε γενωματικό DNA που απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *A. Tumefaciens* C58 (Παράγραφος 3.2.1). Μετά από επαναλαμβανόμενες PCR αντιδράσεις για έλεγχο των καταλληλότερων συνθηκών αντίδρασης προέκυψαν τα αναμενόμενα PCR προϊόντα και ακολούθησε κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®]. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετά την εισαγωγή τους σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) χρησιμοποιήθηκαν για μικρής κλίμακας ετερόλογη έκφραση.

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει στη συνέχεια έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας των επιλεγμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ειδικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως προς το υπόστρωμα CDNB υπέδειξαν οχτώ ένζυμα (*AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, και *AtuGST8*) τα οποία εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές SA και τα οποία εστάλησαν για αλληλούχιση όπου πιστοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των συγκεκριμένων γονιδίων. Η περαιτέρω ανάλυση των ένζυμων *AtuGST1*, *AtuGST2*, *AtuGST3*, *AtuGST4*, *AtuGST5*, *AtuGST6*, *AtuGST7*, και *AtuGST8* συνεχίστηκε με την μελέτη της λειτουργίας τους και έλεγχο της ενζυμικής τους δραστηριότητας έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων. Τα γνωστά υποστρώματα των GSTs ανήκουν κατά πλειοψηφία στην κατηγορία των ξενοβιοτικών συνθετικών χημικών. Ωστόσο, ένας

αριθμός φυσικών προϊόντων φαίνεται να αποτελούν επίσης υποστρώματα για διαφορετικούς τύπους GST ενζύμων. Μερικά από αυτά τα υποστρώματα αντιπροσωπεύουν ενώσεις που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της οξειδωτικού στρες στα κύτταρα και μπορεί να είναι ενδογενή λιπίδια, DNA υδρουπεροξειδία και υδροξυαλκένια (Berhane et al., 1994). Άλλα φυσικά υποστρώματα περιλαμβάνουν στεροειδή, λευκοτριένια, ανθοκυανίνες (Marrs et al., 1995), και οργανικές ισοθειοκυανιούχες ενώσεις (Kolm et al., 1995). Αρκετές GSTs έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν λιπόφιλες ενώσεις που δρουν ως υποκαταστάτες (ligands) άλλα όχι ως υποστρώματα. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 συγκρίνονται τα επίπεδα δραστηριότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών για τα διάφορα υποστρώματα. Η ειδική δραστηριότητα των μελών της οικογένειας *AtuGSTs* προσδιορίστηκε προκειμένου να εξεταστούν οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων που μπορεί να σχετίζονται με τη βιολογική τους λειτουργία. Οι ενζυμικοί προσδιορισμοί συμπεριλαμβάνουν σχηματισμό θειοαιθέρα και θειοεστερα, δηλαδή νουκλεόφιλη προσβολή τόσο στον άνθρακα όσο και στο ηλεκτρονιόφιλο άτομο θείου όταν χρησιμοποιείται μια οργανική ισοθειοκυανιούχα ένωση ως υπόστρωμα. Επιπρόσθετα, οι *AtuGSTs* μελετήθηκαν με σκοπό να διαπιστωθεί αν εμφανίζουν δραστηριότητα υπεροξειδάσης, ρεδοκτάσης του διυδροασκορβικού οξέος ή θειολτρανσφεράσης. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων οδήγησε σε πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα.

Οι *AtuGSTs* χαρακτηρίζονται από μια ευρεία εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις ειδικές τους δραστηριότητες για ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών υποστρωμάτων. Από το σύνολο των αλογονωμένων αρωματικών υποστρωμάτων που εξετάστηκαν, το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), ένα υπόστρωμα “αρυλ-τρανσφεράσης” και τα ανάλογά του [1-βρωμο-2,4-δινιτροβενζόλιο (BDNB), 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (FDNB), 1-ιωδο-2,4-δινιτροβενζόλιο (IDNB)], και το π-νιτροβενζυλχλωρίδιο (pNBC) ένα υπόστρωμα “αραλκυλ-τρανσφεράσης”, ήταν δραστικά με όλα τα ένζυμα παρά τις δραματικές διαφορές (~10-φορές) που παρατηρήθηκαν στις ειδικές δραστηριότητες των ενζύμων. Για παράδειγμα, το *AtuGST4* εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι του CDNB, ενώ το *AtuGST1* έναντι του pNBC.

Η οικογένεια ενζύμων *AtuGSTs* μελετήθηκε και ως προς τη δραστηριότητα υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από τη γλουταθειόνη (GPOX) χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το υδροϋπεροξειδίο του κουμηνίου (CuOOH) και τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο (t-BuOOH). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα υπό μελέτη ένζυμα είναι ικανά να μειώσουν αποτελεσματικά τα δυο αυτά υποστρώματα. Ανάμεσα σε όλες τις *AtuGSTs* που εξετάστηκαν, η *AtuGST4* εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι των συγκεκριμένων υποστρωμάτων. Στο κύτταρο, ο σχηματισμός οργανικών υδρουπεροξειδίων, οφείλεται στην προσβολή οργανικών ενώσεων από ενεργές μορφές οξυγόνου. Οι GSTs συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας έναντι της

οξειδωτικής καταπόνησης καταλύοντας αντιδράσεις εξαρτώμενες από τη γλουταθειόνη. Οι αντιδράσεις αυτές αδρανοποιούν τα προϊόντα της οξειδωτικής καταπόνησης με σύζευξη ή αναγωγή των υδρουπεροξειδίων και σχηματισμό των αντίστοιχων μη-τοξικών αλκοολών (Favaloro et al. 2000, Veal et al. 2002, Esterbauer et al. 1986).

Τα ένζυμα *AtuGST2*, 3, 6, 7 και 8 εμφάνισαν δραστικότητα ρεδοκτάσης του διυδροασκορβικού οξέος (DHAR) καταλύοντας την αναγωγή του διυδροασκορβικού (DHA) σε ασκορβικό οξύ χρησιμοποιώντας GSH. Επιπλέον, μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας ενζύμων (*AtuGST1*, 5, 6, 7, 8) εμφανίζουν δραστικότητα θειολτρανσφεράσης χρησιμοποιώντας τη 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED) ως υπόστρωμα. GSTs με δραστικότητα DHAR έχουν ήδη βρεθεί στο *Arabidopsis* (Dixon et al. 2002), στο ρύζι και τη σόγια (Frona, 2006). Αυτά τα φυτικά ένζυμα, δεν καταλύουν τις αντιδράσεις σύζευξης με τη GSH και αντίθετα με τα περισσότερες άλλες GSTs, είναι μονομερείς και σχηματίζουν μικτά δισουλφίδια με τη GSH [Dixon et al. 2002]. Μέλη της λ τάξης των GSTs φαίνεται ότι εμφανίζουν δραστικότητα θειολτρανσφεράσης χρησιμοποιώντας το HED ως υπόστρωμα (Dixon et al. 2002). Σε περιπτώσεις οξειδωτικής καταπόνησης απουσία GSH, ορισμένες πρωτεϊνικές θειόλες φτιάχνουν πρωτεϊνικά δισουλφίδια μέσω S-θειολίωσης. Ο μετασχηματισμός αυτός φαίνεται να έχει λειτουργικό και/ή προστατευτικό ρόλο για τις πρωτεϊνικές θειόλες μέσω αντιδράσεων θειολίωσης/αποθειολίωσης (Xing & Lou, 2003).

Οι GSTs έχουν ένα καλά χαρακτηρισμένο ρόλο στο να προσδιορίζουν τον μεταβολισμό και την εκλεκτικότητα των ζιζανιοκτόνων-διφαινυλαιθέρων όπως το fluorodifen (Axarli et al., 2009, Dixon et al. 2003). Το fluorodifen είναι ένας διφαινυλαιθέρας, στην ουσία ένα φωτολευκαντικό ζιζανιοκτόνο, και η σύζευξη του με τη GSH καταλύεται από τις GSTs προκειμένου να σχηματιστούν μη-τοξικά S-γλουταθειονυλιωμένα προϊόντα. Τα ριζοβακτηρίδια ως βακτήρια που διαβιούν στην ριζόσφαιρα, δηλαδή στο έδαφος που βρίσκεται σε άμεση επαφή με το ριζικό σύστημα των φυτών, διεισδύουν στις ρίζες των φυτών είτε ενδοκυτταρικά είτε διακυτταρικά και μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν ως σποριακά ενοφθαλμίσματα στη βιοαποκατάσταση/αποτοξίνωση συγκεκριμένων ζιζανιοκτόνων ή άλλων ξενοβιοτικών. Τα ένζυμα *AtuGST2*, *AtuGST3* and *AtuGST5* εμφανίζουν σχετικά υψηλή δραστικότητα έναντι του fluorodifen (Table 3). Σε σύγκριση με τα φυτικά ισοένζυμα από τη φ (π.χ. *ZmGSTF1-1*) (Dixon et al. 2003) και τ τάξη (π.χ. *GmGSTU4-4*) (Axarli et al., 2009), οι *AtuGSTs* έχουν συγκριτικά χαμηλότερες δραστικότητες έναντι του fluorodifen. Η καταλυτική δράση των GSTs στη σύζευξη του ζιζανιοκτόνου fluorodifen παρατηρήθηκε για μερικά στελέχη Gram-αρνητικών ριζοβακτηριδίων, ειδικά αυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Pseudomonadaceae* και *Enterobacteriaceae* (Zablotowicz et al. 1994).

Οι *AtuGSTs* ελέγχθηκαν επίσης για πιθανή δραστικότητα εστεράσης χρησιμοποιώντας την οξική p-νιτροφαινόλη (p-NPA) ως πρότυπο υπόστρωμα. Ανάμεσα σε όλα τα εξεταζόμενα ισοένζυμα, το *AtuGST6* εμφάνισε την υψηλότερη δραστικότητα εστεράσης. Με εξαίρεση το υπόστρωμα CuOOH, η δραστικότητα του ενζύμου *AtuGST6* ως προς το pNBC είναι αξιοσημείωτη ανάμεσα σε όλα τα άλλα υποστρώματα που εξετάστηκαν, υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ενζυμικό ρόλο εστεράσης για το συγκεκριμένο ισοένζυμο.

Οι *AtuGSTs* δεν καταλύουν αποτελεσματικά την προσθήκη της σουλφωδρυλομάδας της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κεντρικό άτομο άνθρακα των ισοθειοκυανικών ενώσεων (χρησιμοποιώντας τον φαινυλαιθυλ-εστέρα και τον ισοθειοκυανικό αλλυλ-εστέρα ως υποστρώματα) προς σχηματισμό διθειοκαρβαμιδίων [R-NH-C(=S)-SG]. Το ενδιαφέρον με τις ισοθειοκυανικές ενώσεις επικεντρώνεται στο γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές βρέθηκε να έχουν χημειοπροστατευτική δράση στον σχηματισμό όγκων σε διάφορα ζώα (Kolm et al. 1995). Πρόσφατα, μια καινούρια τάξη βακτηριακών GSTs (χ τάξη) προερχόμενη από κυανοβακτήρια, βρέθηκε να καταλύει τη σύζευξη φυσικών ισοθειοκυανικών ουσιών από φυτά με τη GSH και μάλιστα με υψηλούς ρυθμούς (Wiktelius & Stenberg, 2007).

Η βρωμοσουλφοφθαλεΐνη και το nitrobenzofurazan, παρόλο που είναι γνωστό ότι έχουν τη δυνατότητα σύζευξης με τη GSH (Sano et al. 2002, Sommer et al. 2003), δεν φαίνεται να αποτελούν αποτελεσματικά υποστρώματα για τα *AtuGST* ισοένζυμα. Παρόμοια, οι *AtuGSTs* δεν φαίνεται να συζεύονται αποτελεσματικά με το εθακρυνικό οξύ, τη trans-4-φαινυλβουτ-3-εν-2-όνη και την trans-2-ενενάλη. Τα υποστρώματα αυτά θεωρείται ότι σχηματίζουν συζευγμένα με τη GSH προϊόντα μέσω αντίδρασης προσθήκης Michael στο α,β -ακόρεστο καρβονυλικό τμήμα του μορίου (Esterbauer et al., 1986).

Λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων των ισοενζύμων GST που απομονώθηκαν από το βακτήριο *A. tumefaciens* C58, η πρωτεΐνη *AtuGST4* επιλέχθηκε προκειμένου να αναλυθεί σε φυλογενετικό επίπεδο.

Η κατασκευή φυλογενετικών δένδρων βασίστηκε στις αμινοξικές αποκλίσεις μεταξύ των αλληλουχιών της υπό μελέτη πρωτεΐνης *AtuGST4* και αντιπροσώπων όλων των γνωστών μέχρι σήμερα τάξεων των ένζυμων GSTs από διάφορους οργανισμούς. Το φυλογενετικό δέντρο που σχεδιάστηκε με τη μέθοδο UPGMA (Σχήμα 3.13) δείχνει ότι η *AtuGST4* σχηματίζει έναν ξεχωριστό κλάδο ο οποίος δεν ομαδοποιείται σε καμιά γνωστή τάξη GST υποδεικνύοντας μεγάλο βαθμό απόκλιση από τις μέχρι τώρα γνωστές χαρακτηρισμένες GST τάξεις. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στα πολικής και ακτινικής μορφής φυλογενετικά

δένδρα τα οποία κατασκευαστήκαν με τη μέθοδο Neighbour-Joining (Σχήματα 3.12, 3.14). Η πρωτεΐνη *AtuGST4* ενδεχομένως ανήκει σε μία νέα μη χαρακτηρισμένη τάξη GSTs η οποία ωστόσο μοιράζεται εξελικτικά κοινούς προγόνους με άλλα ένζυμα GST. Μία προσεκτική ανάλυση του φυλογενετικού δένδρου (Σχήμα 3.14) το οποίο κατασκευάστηκε με σκοπό τη σύγκριση της πρωτεΐνης με ήδη γνωστές ομαδοποιημένες GSTs όλων των τάξεων επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση. Το ένζυμο *AtuGST4* και οι GSTs της θ και κ τάξης αποτελούν ενδεχομένως απόγονα είδη ενός κοινού προγόνου ή πιο σωστά φαίνεται να έχουν μια στενότερη εξελικτική σχέση με την πρωτεΐνη *AtuGST4* σε σύγκριση με το σύνολο των GST ενζύμων που εξετάστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μοριακή, κινητική και δομική
ανάλυση του ενζύμου *AtuGST4*

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διαφορετικές τάξεις των ενζύμων GSTs που έχουν προσδιοριστεί (όπως οι α , μ , π , θ , σ , ζ και ω στα θηλαστικά, φ και τ στα φυτά, δ στα έντομα και β στα βακτήρια), βασίζονται κυρίως στην σύγκριση και ανάλυση των αλληλουχιών τους (Armstrong 1997, Board et al., 2000, Polekhina et al., 2001). Ένα σημαντικό στοιχείο που θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της λειτουργικότητας και της αμινοξικής ποικιλότητας των ενζύμων GSTs ενδεχομένως να είναι κάποια συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται ανάμεσα στις GSTs όλων των τάξεων παρά τις συχνά εκτεταμένες αποκλίσεις στην ακολουθία τους. Αξίζει να αναφερθεί ότι μετά την αποσαφήνιση της πρώτης GST δομής το 1991, έχουν βρεθεί, αναλυθεί και δημοσιευθεί οι κρυσταλλικές δομές πολλών ενζύμων όλων των τάξεων (Armstrong, 1994, Dirr et al., 1994, Reinemer et al., 1996, Wilce & Parker, 1994) συμπεριλαμβανομένων των δομών της θ τάξης ενζύμων από την αυστραλιανή μύγα *Lucilia cuprina* (Wilce et al., 1995) και το φυτό *Arabidopsis thaliana* (Reinemer et al., 1996).

Τα συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν υιοθετούνται σε όλες τις γνωστές δομές GSTs όλων των τάξεων και περιλαμβάνουν ομοδιμερείς πρωτεΐνες στις οποίες κάθε μονομερές αναδιπλώνεται σε μια διάταξη η οποία αποτελείται από δυο διακριτές δομικές περιοχές. Η N-τελική δομική περιοχή αντιπροσωπεύει κυρίως την περιοχή δέσμευσης της γλουταθειόνης και αποτελείται από ένα βαβαββα μοτίβο, ενώ η C-τελική δομική περιοχή, μοτίβου α -έλικας, εμπλέκεται πρωτίστως στη δέσμευση υδρόφοβων υποστρωμάτων. Ωστόσο, πολλαπλές ευθυγραμμίσεις GST αλληλουχιών υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των αμινοξικών καταλοίπων που είναι υψηλά συντηρημένα στα ένζυμα της α , μ και π τάξης δεν διατηρούνται στις βακτηριακές και άλλες GSTs της θ τάξης (Rossjohn et al., 1996, Reinemer et al., 1996).

Το γεγονός αυτό τονίζει την ποικιλομορφία των πρωτεϊνικών GST αλληλουχιών η οποία επιτρέπει σε διαφορετικά GST ένζυμα να εμφανίζουν μια ευρεία ποικιλία εξαρτώμενων από τη γλουταθειόνη λειτουργιών σύζευξης. Αν και καμία πρωτεΐνη δεν έχει βρεθεί να υιοθετεί την ίδια συνολικά τοπολογία των GSTs, η N-δομική περιοχή της GST από σκώτι ανθρώπου εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την υπεροξειδάση, θερεδοξίνη και γλουταρεδοξίνη του γλουταθειού (Sinning et al., 1993). Η N-τελική δομική περιοχή των GSTs μπορεί για αυτό τον λόγο να χαρακτηριστεί ως μια κανονική περιοχή δέσμευσης του GSH. Εκτός από τα παρατηρούμενα συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά στις GSTs όλων των τάξεων, αρκετές διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ πρωτεϊνικών δομών που συγκαταλέγονται στην ίδια τάξη όπως των GST ενζύμων της θ τάξης (Reinemer et al., 1996, Wilce et al., 1995). Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζονται τόσο στο χαμηλό επίπεδο ομοιότητας της αλληλουχίας μεταξύ των δυο

GSTs από τα *L. cuprina* και *A. thaliana* (21,6%) όσο και στις διακριτές βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες των συγκεκριμένων ενζύμων. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη από το *L. cuprina* είναι ιδιαίτερα δραστική με το CDNB, ενώ το φυτικό ένζυμο όχι. Επιπρόσθετα, μια δεύτερη περιοχή δέσμευσης της γλουταθειόνης παρατηρήθηκε σε φυτική GST (Reinemer et al., 1996). Αυτό οδηγεί στην θεωρία ότι κατ'αναλογία μεγάλες δομικές διαφορές είναι δυνατό να αναμένουμε και στις βακτηριακές GSTs.

Οι περισσότερες βακτηριακές GSTs που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα ανήκουν στη β τάξη και μέχρι το 1998 είχαν αποσαφηνιστεί οι κρυσταλλικές δομές τεσσάρων αντιπροσώπων της συγκεκριμένης τάξης: οι *P. mirabilis* GST (PmGST) (Di Ilio et al., 1988), *E. coli* GST (EcGST) (Nishida et al., 1988), *B. xenovorans* BphK (BxGST) (Elitza et al., 2006) και *O. anthropi* GST (OaGST) (Favaloro et al., 2000). Εντούτοις, εμφανίζοντας 54% ταυτοσημία στις αμινοξικές τους ακολουθίες, οι δυο β τάξης πρωτεΐνες από τα *Escherichia coli* (Nishida et al. 1998) και *Proteus mirabilis* (Rossjohn et al. 1998) έχουν σχεδόν παρόμοιες δομές και αντιπροσωπεύουν μονό ένα μικρό δείγμα της ποικιλότητας των γνωστών βακτηριακών GSTs. Δυο βακτηριακές πρωτεΐνες των οποίων οι κρυσταλλικές δομές έχουν επίσης αποσαφηνιστεί (η DsbA και η HCCA ισομεράση), εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με τις μιτοχονδριακές GSTs της κ τάξης (Martin et al., 1993, Thompson et al., 2007).

Πολλές μελέτες βασισμένες στην πρωτεϊνική μηχανική που έχουν διεξαχθεί στις ευκαρυωτικές GSTs της α , μ και π τάξης, έχουν ήδη επισημάνει τον ρόλο πολλών αμινοξικών καταλοίπων στη δομική και λειτουργική υπόσταση αυτών των ενζύμων. Αντιθέτως, ανάλογες μελέτες με ένζυμα GSTs από βακτηριακούς οργανισμούς είναι ελάχιστες και επικεντρώνονται στην σπουδαιότητα ενός αμινοξικού καταλοίπου τυροσίνης στη N-τελική δομική περιοχή της πρωτεΐνης αμινοξύ το οποίο θεωρείται απαραίτητο και για την λειτουργία των πρωτεϊνών των α , μ και π τάξεων. Στα ένζυμα αυτά, η υδροξυλομάδα της τυροσίνης τοποθετείται κοντά στο θείο της γλουταθειόνης και συνεισφέρει στην ενίσχυση της νουκλεόφιλης συμπεριφοράς της μέσω δεσμών υδρογόνου (Armstrong, R. N. 1994., Dirr et al., 1994, Wilce et al., 1994). Παρόλο που το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνης είναι παρών στην πλειοψηφία των GSTs της θ τάξης, η ακριβής του θέση ποικίλλει περισσότερο στα ένζυμα της θ τάξης συγκριτικά με τις GSTs της α , μ και π τάξης ενώ μερικές θ GSTs μπορεί ακόμη και να στερούνται του συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου. Πράγματι, η αντικατάσταση της N-τελικής τυροσίνης σε μια GST θ τάξης από *Drosophila* (Lee & Tu, 1995) και σε μια *E. coli* GST (Nishida et al., 1994) δεν είχε καμία ιδιαίτερη επίδραση στην δραστικότητα των ενζύμων. Επίσης, κρυσταλλογραφικές μελέτες στην θ τάξης GST από το *L. cuprina* έδειξαν ότι το αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνης είναι τόσο μακριά από το ενεργό κέντρο που δεν δύναται να

αλληλεπιδράσει με τη σουλφυδρυλομάδα της γλουταθειόνης (Wilce et al., 1995). Τη θέση της τυροσίνης έχει πάρει ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης το οποίο φαίνεται να ενισχύει το νουκλεόφιλο χαρακτήρα της γλουταθειόνης. Με τη βοήθεια μεθόδων πρωτεϊνικής μηχανικής βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη σερίνη είναι απαραίτητη στην καταλυτική δραστηριότητα ενζύμων όπως στο στέλεχος *L. cuprina* και στην απαλογονάση του διχλωρομεθανίου (DCMD) από το στέλεχος DM11 (Board et al., 1995, Vuilleumier & Leisinger, 1996). Λαμβάνοντας υπόψη τις μεγάλες διαφορές στις καταλυτικές ιδιότητες και τις αλληλουχίες των βακτηριακών GSTs, η πρωτεϊνική μηχανική φαίνεται να αποτελεί μια σπουδαία τεχνική για λεπτομερή ερευνά της σχέσης δομής-λειτουργίας των βακτηριακών GST πρωτεϊνών.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4* ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ NI-NTA-IMAC.

Την έκφραση του ενζύμου σε βακτήρια *E. coli* η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.4.13., ακολούθησε η διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C. Αρχικά, ο προσροφητής NTA-αγαρόζη 0,5ml αναγεννάται με 5 ml διαλύματος EDTA 0.1M και 10ml dd H₂O. Στη συνέχεια, ο προσροφητής φορτίζεται με διάλυμα NiCl₂·6H₂O, 50mM, όγκου 2ml, το οποίο παρασκευάζεται φρέσκο σε κάθε διαδικασία καθαρισμού. Ακολουθεί εξισορρόπηση της στήλης με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄, 50mM περιεκτικότητας 0,3M σε NaCl, pH 8. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα όγκου 1,5ml φορτώνεται και αφού το ένζυμο προσροφηθεί, πραγματοποιείται έκπλυση του προσροφητή με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ 50mM περιεκτικότητας 0,3M σε NaCl, pH 8 και με 10ml του ίδιου διαλύματος με pH 6,2, ώστε να απομακρυνθούν το μη-προσροφημένο στη στήλη υλικό και οι χαλαρά δεσμευμένες πρωτεΐνες. Ακολουθεί βαθμιδωτή έκλυση της πρωτεΐνης με την εφαρμογή διαλύματος ιμιδαζολίου 5mM, 20mM, 0,1M, 0,2M και 0,5M. διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης. Συλλέγονται όλα τα εκλούμενα από τη στήλη κλάσματα (κλάσματα όγκου 2 mL) και γίνεται έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 2.4.19.1) και προσδιορισμός της πρωτεΐνης (παράγραφος 2.4.10).

Πριν την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970), τα πρωτεϊνικά δείγματα υποβάλλονται σε διαπίδυση για 20h σε διάλυμα Tris-HCl, 0,01M, pH 8 όγκου 2l ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο των εκλούσεων.

4.2.2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κινητικής συμπεριφοράς του άγριου τύπου AtuGST4 και των μεταλλαγμένων μορφών της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Οι μέθοδοι ενζυμικού προσδιορισμού που εφαρμοσθήκαν χρησιμοποιώντας μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων CDNB/GSH, CuOOH/GSH και t-BuOOH/GSH και HED/GSH περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.4.19.1., 2.4.19.2. και 2.4.19.3. αντίστοιχα. Στα γραφήματα της κινητικής ανάλυσης παρουσιάζονται τα σφάλματα που προέκυψαν από την επανάληψη των πειραματικών μετρήσεων και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος SigmaPlot 11.0 (<http://www.sigmaplot.com>).

4.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ.

Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των υποστρωμάτων CDNB/GSH σε θερμοκρασιακό εύρος από 0-55°C για δυο διαφορετικές τιμές pH 7,6 και 7,9 συμφωνά με τη μέθοδο του φωτομετρικού προσδιορισμού των ενζύμων GST (παράγραφος 2.4.19.1). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius και Eyring και προέκυψαν οι γραφικές παραστάσεις $\ln V_{\max}$ και $\ln k_{\text{cat}}$ συναρτήσεως του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας (1/T).

4.2.4. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΞΩΔΕΣ.

Η επίδραση του ιξώδους στη διαμόρφωση των κινητικών σταθερών της πρωτεΐνης AtuGST4 και των μεταλλαγμένων μορφών πραγματοποιήθηκε για τα υποστρώματα CDNB και CuOOH υπό τις συνθήκες των φωτομετρικών προσδιορισμών που περιγράφονται στις παραγράφους 2.4.19.1 και 2.4.19.2. αντιστοίχως, με τη διαφορά ότι τα ρυθμιστικά διαλύματα των προσδιορισμών περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Οι τιμές του ιξώδους (η) στους 37 °C υπολογίστηκαν συμφωνά με τους Wolf et al. (1985).

4.2.5. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.

Με σκοπό να υπολογιστούν οι τιμές T_m της πρωτεΐνης για δυο διαφορετικές τιμές pH 7,6 και 7,9 μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των ενζύμων για το εύρος θερμοκρασιών 35-60 °C. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει επώαση ενζύμων δειγμάτων για χρονικό διάστημα 5 min. Ακολουθεί υπολογισμός της υπολείπουσας δραστηριότητας των δειγμάτων εφαρμόζοντας τη φωτομετρική διαδικασία που αναλύεται στην παράγραφο 2.4.19.1.

4.2.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Η ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης *AtuGST4* ελέγχεται με την προσθήκη δύο ουσιών που αποτελούν παράγοντες σταθεροποίησης: της γλουταθειόνης και της γλυκερόλης. Σε τελικό όγκο 0,3 ml διαλύματος 0,1M φωσφορικού καλίου pH 7,9 προστίθεται καθαρή πρωτεΐνη. Προετοιμάζονται δύο ακόμη διαλύματα όπου η αναλογία ενζύμου/προσθετικής ουσίας είναι 2/1 και πραγματοποιείται φωτομετρικός προσδιορισμός (παράγραφος 2.4.19.1) της ενζυμικής δραστηριότητας μετά από επώαση των διαλυμάτων σε θερμοκρασία 25°C για χρονικό διάστημα 0-20h. Από τα αποτελέσματα προκύπτει η σύγκριση της δραστηριότητας (σε U/mL) του καθαρού ενζύμου απουσία οποιασδήποτε ουσίας με τα ενζυμικά δείγματα παρουσία γλουταθειόνης και γλυκερόλης, συναρτήσει του χρόνου.

4.2.7. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Πραγματοποιήθηκε επιτυχής κρυσταλλοποίηση καθαρής πρωτεΐνης *AtuGST4* συγκέντρωσης 20 mg που περιέχεται σε 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα Tris, pH 7. Για την κρυσταλλοποίηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop vapor diffusion method). Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης, η συλλογή των πειραματικών δεδομένων και η επίλυση της δομής πραγματοποιήθηκαν με περιθλαση ακτίνων-X στο Κέντρο Βιοτεχνολογίας του Τούρκου (Turku) στη Φινλανδία από τον Δρ. Α. Παπαγεωργίου και την ομάδα του.

4.2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΪΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ.

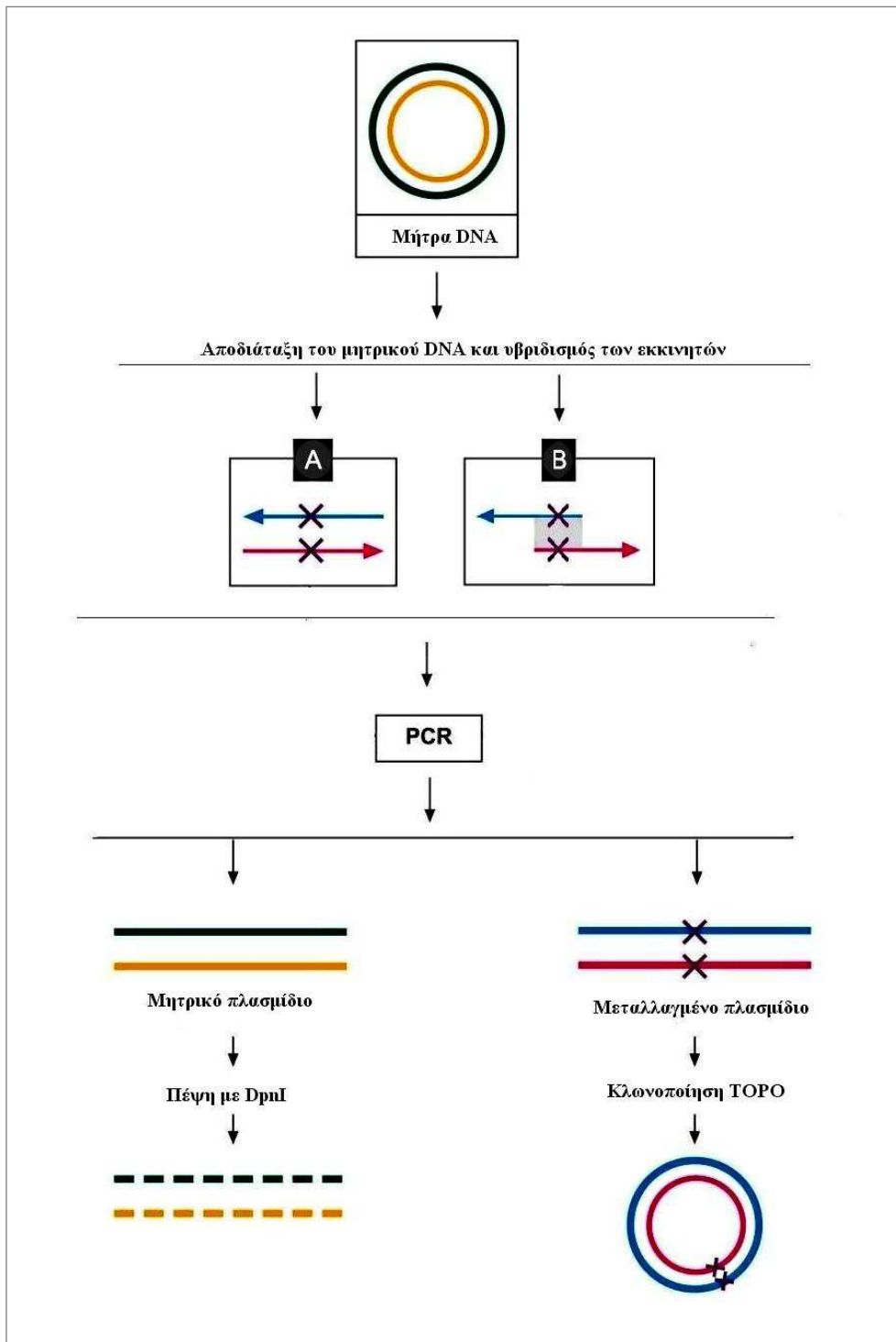
Για την αναπαράσταση των κρυσταλλικών δομών χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PyMOL (DeLano, 2002, <http://pymol.sourceforge.net/>) και VMD 1.8.6 (Humphrey et al., 1996, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Οι αλληλεπιδράσεις προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα iMolTalk (<http://i.mol.talk.org/>). Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών στοιχείων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PISA (http://www.ebi.ac.uk/msdsrv/prot_int/pistart.html). Οι χάρτες Ramachandran σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού RAMPAGE (Lovell et al., 2002).

4.2.9. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4* ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ *Ser25* ΚΑΙ *Phe22* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ QUICK CHANGE PCR.

Η τεχνική της Quick Change PCR (Σχήμα 4.1.) εφαρμόστηκε με σκοπό να πραγματοποιηθεί κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου *AtuGST4*. Οι μεταλλάξεις αφορούν τα αμινοξέα στις θέσεις *Phe22* και *Ser25* τα οποία μετατραπήκαν σε *Ala*. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη τεχνική σχεδιάζονται δύο εκκινητές που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη (Πίνακας 4.1), ο καθένας συμπληρωματικός με τις απέναντι αλυσίδες του δίκλωνου πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη βοήθεια μιας πολυμεράσης διορθωτικής ανάγνωσης (proofreading, Pfu DNA πολυμεράση). Η ενσωμάτωση των εκκινητών δημιουργεί ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο το οποίο περιέχει εγκοπές που δεν επικαλύπτονται. Το μίγμα κάθε αντίδρασης PCR περιέχει 10X ρυθμιστικό διάλυμα Pfu DNA πολυμεράσης, 0,2 mM από καθένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTPs), 8 pmol από τον κάθε εκκινητή (fGSTF9-rGSTF9, fGSTS9-rGSTS9), 0,5 U Pfu DNA πολυμεράσης και 7 ng DNA ως μήτρα. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε είναι το ακόλουθο: η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν 30 κύκλοι των 2 min στους 95 °C, 2 min στους 55 °C και 8 min στους 72 °C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 10 min.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών fGSTF9, rGSTF9, fGSTS9, rGSTS9, fGSTR9, rGSTR9 (των μεταλλαγμένων μορφών) και fGSTD9, rGSTD9 (του ενζύμου *AtuGST4*).

Εκκινητής	Νουκλεοτιδική ακολουθία (5' 3')
Εκκινητές με τροποποιημένα κωδικόνια	
fGSTF9	CGATCACCGTTGCGGAACGCTCTCC
rGSTF9	GGAGAGCGTTCGCAACGGTGATCG
fGSTS9	CGTTTTTGAACGCGCGCCCGATGGCGG
rGSTS9	CCGCCATCGGGCGCGGTTCAAAAACG
fGSTR9	CGTCTTACGCGCGCTGGAATCG
rGSTR9	CGATTCCAGCGCGGTAAGACG
Εκκινητές γονιδίου της πρωτεΐνης <i>AtuGST4</i>	
fGSTD9	ATGTCAAATATCGAAACAGTCCCC
rGSTD9	TCAGTTCTTTGAGGCCGCGGTGAA



ΣΧΗΜΑ 4.1. Συνολική σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών PCR, Quick Change με χρήση συμπληρωματικών εκκινητών (A) και επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap/extension) με αλληλεπικαλυπτόμενους εκκινητές (B) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου *AtuGST4*.

Ακολουθεί πέψη των προϊόντων PCR με Dpn I. Το Dpn I είναι μια ενδονουκλεάση ειδική για μεθυλωμένο και ημιμεθυλωμένο DNA και χρησιμοποιείται για την πέψη του μητρικού DNA. Το DNA που απομονώνεται από σχεδόν όλα τα στελέχη *E. coli* είναι μεθυλωμένο και ως εκ τούτου επιδέχεται πέψη με Dpn I (Parworth et al., 1996). Το πλασμίδιο που φέρει τις εγκοπές περιέχει και την επιθυμητή μετάλλαξη και μπορεί να μετασχηματιστεί σε δεκτικά κύτταρα BL21DE3 (Παράγραφος 2.4.2).

4.2.10. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ATUGST4 ΣΤΗ ΘΕΣΗ ARG187 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΛΥΣΙΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ (OVERLAP EXTENSION).

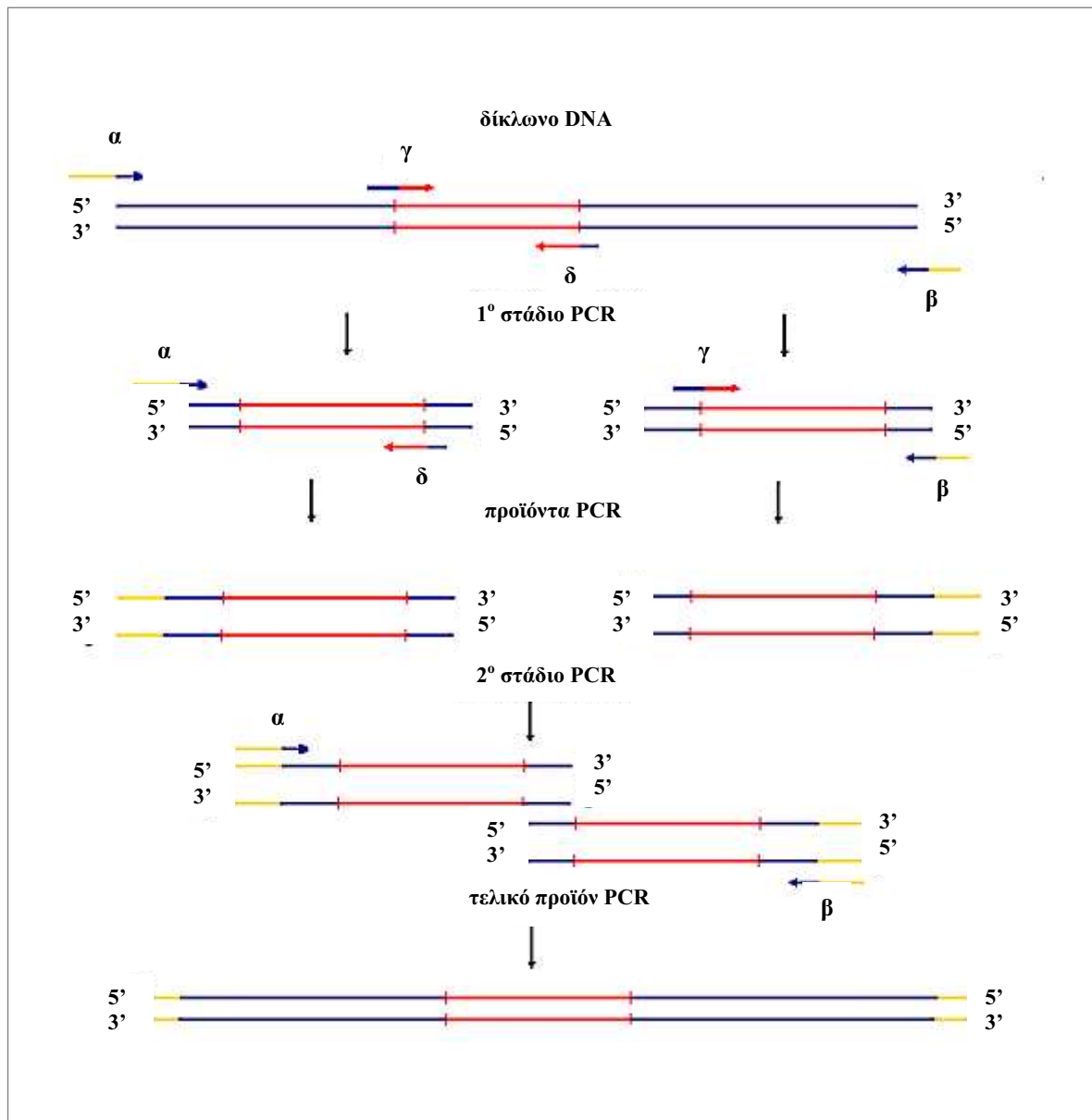
Η σημειακή μετάλλαξη του ενζύμου AtuGST4 με σκοπό την αντικατάσταση της Arg187 από Ala, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap extension). Η PCR δύο ή περισσότερων σταδίων (Ho et al., 1989, Frillingos et al., 1994, Karatza et al., 2006) χρησιμοποιεί κατάλληλα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) για να δημιουργήσει από τα γονίδια-στόχους τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (στάδιο 1, Σχήμα 4.2). Τα προϊόντα του σταδίου 1 συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε επόμενες αντιδράσεις PCR, όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και, με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων του σταδίου 1, επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (στάδιο 2, Σχήμα 4.2). Εφόσον απαιτείται από το πρωτόκολλο, τα νέα αυτά προϊόντα, του σταδίου 2, μπορούν και πάλι να συνδυασθούν και να υποβληθούν σε νέα αντίδραση PCR, και ούτω καθεξής (Sahin-Toth et al., 2000b). Η ανωτέρω μεθοδολογία, που περιγράφεται συνήθως ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Ho et al., 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χιμαιρικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς κωδικόνια Cys (C-less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos et al., 1994, Sahin-Toth et al., 2000b, Frillingos and Kaback, 2001, Karatza et al., 2006). Το βασικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία φαίνεται διαγραμματικά στο Σχήμα 4.2. Στο τέλος κάθε σταδίου τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αгарόζης (1%).

Το μίγμα των αντιδράσεων PCR του 1ου σταδίου περιέχει 10x ρυθμιστικό διάλυμα Pfu DNA πολυμεράσης, 0,2 mM από καθένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTPs), 8 pmol από τον κάθε εκκινητή (fGSTD9-rGSTA9, fGSTA9-rGSTD9), 0.5 U Pfu DNA πολυμεράσης. Ως μήτρα και για τις δύο PCR του 1ου σταδίου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο AtuGST4. Το μίγμα της αντίδρασης του 2ου σταδίου PCR περιέχει 10x ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης, 200 μM dNTPs, 8 pmol από τον κάθε εκκινητή fGSTD9 και

rGSTD9, 1 U Taq DNA πολυμεράση και ως μήτρα 10ng από το κάθε ένα από τα προϊόντα του 1ου σταδίου PCR. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αντιδράσεις PCR είναι το ακόλουθο: η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 95 °C για 5 min. Ακολούθησαν 35 κύκλοι των 1 min στους 95 °C, 1 min στους 55 °C και 3 min στους 72 °C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 10 min.

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων του 1ου σταδίου, πριν την τελική PCR, υποβάλλονται σε πέψη με το ένζυμο DpnI έτσι ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του μητρικού πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε αρχικά. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 μ L και οι ποσότητες που προστίθενται είναι: 15 μ L από το προϊόν της PCR (150 ng), 2 μ L (20 U) από το ένζυμο DpnI και 2 μ L από το 10x ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 3,5 h στους 37 °C. Η απενεργοποίηση του DpnI πραγματοποιείται με θερμική κατεργασία στους 80 °C για 20 min. Στο τέλος του 1ου σταδίου τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αгарόζης (1%) και ανακτώνται με τη βοήθεια πακέτου υλικών καθαρισμού DNA (QIAquick™ Gel Extraction Kit Qiagen (Γερμανία)).

Μετά την τελική PCR ακολούθησε κλωνοποίηση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21(DE3) με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του TOPO Cloning η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.4.9. Το προϊόν PCR παρήχθη με Taq DNA πολυμεράση η οποία έχει την ιδιότητα να προσθέτει στο τέλος της αντιγραφής αδενίνες και να συνθέτονται έτσι μόρια DNA που να φέρουν στο 3' άκρο τους επιπλέον νουκλεοτίδια αδενίνης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ιδιότητα του γραμμοποιημένου TOPO πλασμιδίου να διαθέτει στα 3' άκρα του προεξέχουσες θυμίνες, διευκολύνουν την αύξηση της αποτελεσματικότητας της κλωνοποίησης, διότι τα προεξέχοντα αυτά νουκλεοτίδια υβριδίζονται λόγω συμπληρωματικότητας.



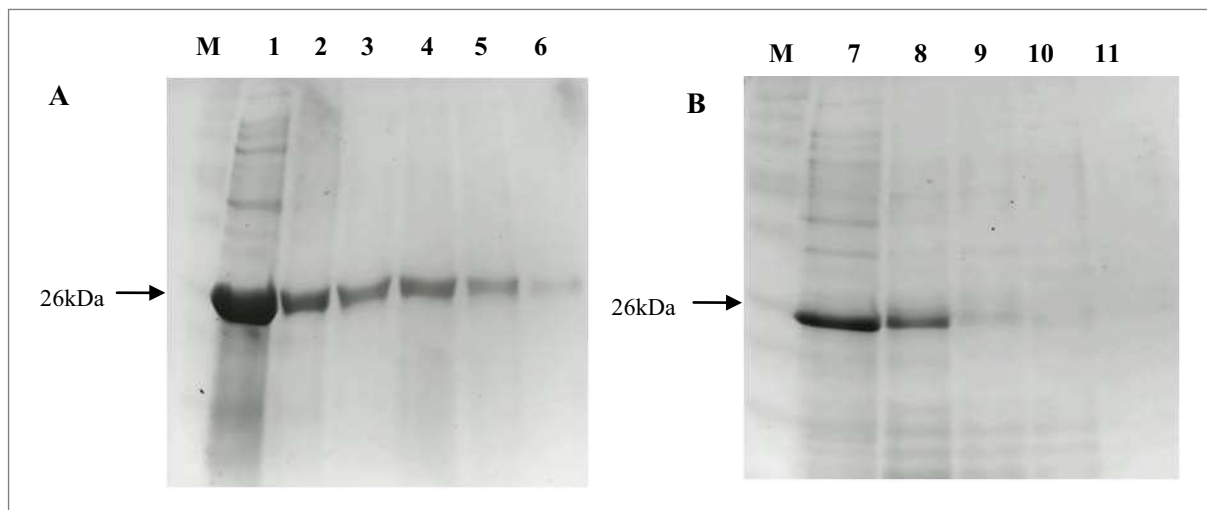
ΣΧΗΜΑ 4.2. Αναλυτικό σχεδιάγραμμα της μεθόδου PCR επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap/extension) που χρησιμοποιήθηκε για την κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του ενζύμου *AtuGST4*.

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4* ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.

Οι αρχικές προσπάθειες καθαρισμού του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH συμφωνά με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην

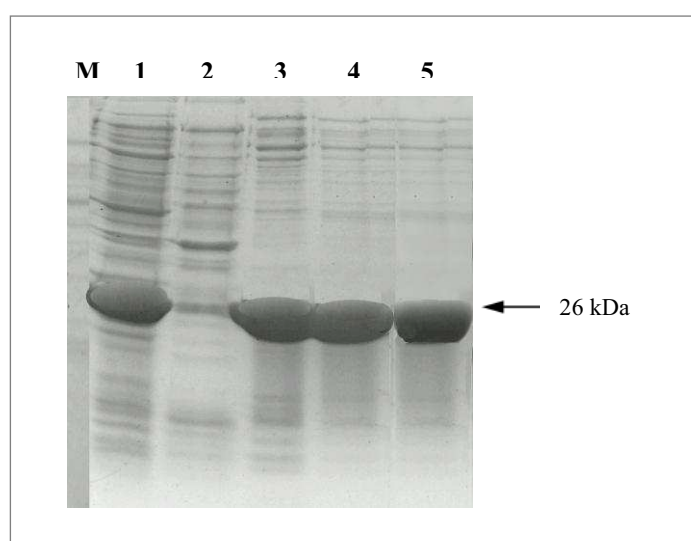
παράγραφο 2.4.16. Για τον καθαρισμό του ενζύμου δοκιμάστηκε ένα εύρος pH και ένα πλήθος από διαφορετικές συνθήκες έκλυσης έτσι ώστε να πετυχουμε την καλύτερη δυνατή απόδοση καθαρισμού της πρωτεΐνης. Μεταξύ των συνθηκών που μελετήθηκαν, αξίζει να αναφερθούν οι αλλαγές που εφαρμοσθήκαν στο βασικό πρωτόκολλο καθαρισμού και αφορούσαν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης του προσροφητή και των εκλούσεων της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν 5 διαφορετικοί χειρισμοί χρησιμοποιώντας 5 διαφορετικές τιμές pH (pH: 6, 6.5, 7, 7.5 και 8) κατά τα στάδια της προσρόφησης και των εκλούσεων. Η καθαρότητα των ενζύμων εκτιμήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) (Σχήμα 4.3.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου (95%) δεν συγκρατείται στον προσροφητή και εκροφάται μετά τη φόρτωση του διαλύματος έκπλυσης του προσροφητή.



ΣΧΗΜΑ 4.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. A: καθαρισμός του ενζύμου *AtuGST4* με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH στον οποίο οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 8 και η έκπλυση του προσροφητή σε pH:6 B: καθαρισμός του ενζύμου *AtuGST4* με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH στον οποίο οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 8 και η έκπλυση του προσροφητή σε pH:7 Θέση M: μάρτυρας μοριακής μάζας (Protein Market Broad Range) θέσεις 1, 7: έκπλυση του προσροφητή με ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 20mM, pH 6 και pH 7 αντίστοιχα, θέσεις 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11: ηλεκτροφορικό αποτύπωμα των εκλούσεων της καθαρής πρωτεΐνης *AtuGST4* που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH. Σημειώνεται η μοριακή μάζα της πρωτεΐνης *AtuGST4* στα 26kDa περίπου.

Εξαιτίας του μη ικανοποιητικού καθαρισμού με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH, πραγματοποιήθηκε απόπειρα καθαρισμού της πρωτεΐνης και με χρωματογραφία συγγένειας σε μεταλλοχημικό προσροφητή Ni-NTA-αγαρόζη (παράγραφος 2.4.17).

Τα αποτελέσματα του καθαρισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Η απόδοση καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) έφτασε στο 100% περίπου. Η καθαρότητα των ενζύμων εκτιμήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) (Σχήμα 4.4.).



ΣΧΗΜΑ 4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. Θέση M: μάρτυρας μοριακής μάζας (Protein Market Broad Range). Θέση 1: ακατέργαστο εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη AtuGST4 μετά από προσθήκη IPTG κατά την έκφραση, θέση 2: μη προσροφημένο κλάσμα θέσεις 3, 4, 5: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων της καθαρής πρωτεΐνης AtuGST4 που πραγματοποιήθηκαν με διάλυμα ιμιδαζολίου σταδιακά αυξανόμενων συγκεντρώσεων 5mM, 20mM και 0.1M αντίστοιχα μέσω χρωματογραφίας συγγένειας σε προσροφητή Ni-NTA. Σημειώνεται η μοριακή μάζα της πρωτεΐνης AtuGST4 στα 26kDa περίπου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2. Αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου AtuGST4 από ακατέργαστο εκχύλισμα μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με χρωματογραφία στήλης στον προσροφητή Ni-NTA σε θερμοκρασία 4 °C.

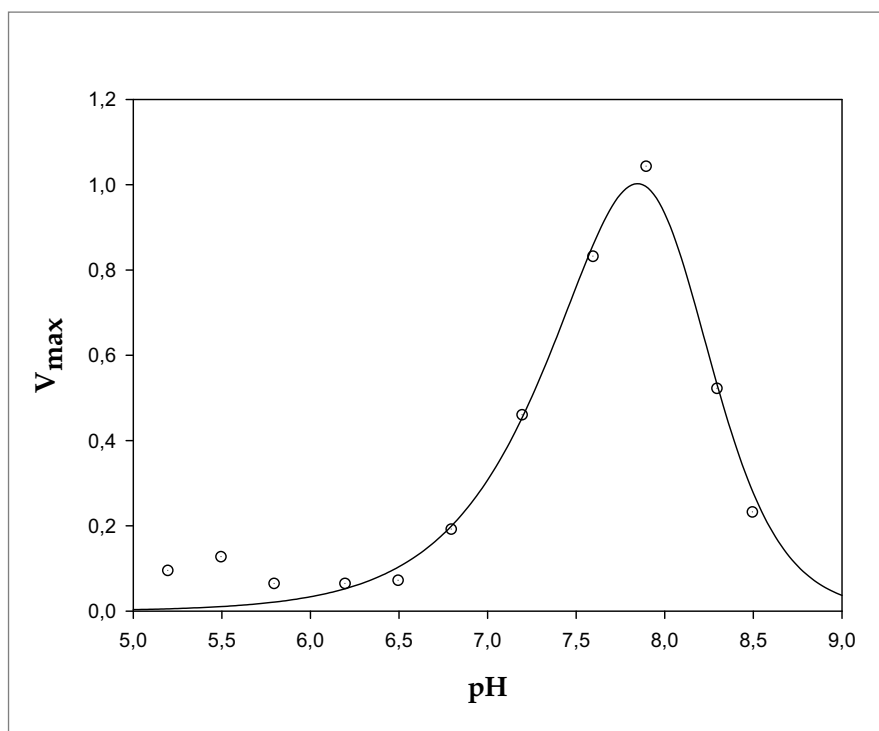
Στάδιο	Όγκος (mL)	Ενζυμική δραστηριότητα (U)	Πρωτεΐνη (mg)	Ειδική δραστηριότητα	Καθαρισμός (φορές)	Απόδοση (%)
Ακατέργαστο εκχύλισμα	6	18,21	9,3	1,95	-	>98
Χρωματογραφία συγγένειας IMAC	12	18,21	1,16	15,69	8,04	>98

4.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.

Η εξάρτηση της ενζυμικής δράσης από το pH σχετίζεται με την παρουσία ιονιζόμενων ομάδων στο ένζυμο. Οποιαδήποτε αλλαγή στην τιμή του pH, προκαλεί αλλαγή στην ιοντική κατάσταση των συστατικών του ενζυμικού συστήματος, δηλαδή του ενζύμου, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, του υποστρώματος και των άλλων άμεσων και έμμεσων συστατικών. Τα ένζυμα, σαν ενώσεις πρωτεϊνικής φύσης, περιλαμβάνουν πολλές ομάδες που μπορούν να ιονιστούν οι οποίες βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σε γειτονικές ή σε απομακρυσμένες από το ενεργό κέντρο περιοχές. Επειδή όμως έχει παρατηρηθεί ότι η καταλυτική δράση ενός ενζύμου εμφανίζεται σε μία στενή περιοχή του pH, είναι πιθανό μόνο μία από τις ιοντικές μορφές του ενζύμου (ή καλύτερα του ενεργού κέντρου του) να είναι ενεργή. Η αλλαγή στην ιοντική κατάσταση των ομάδων του ενζύμου, που είναι απομακρυσμένες από το ενεργό του κέντρο, έχει ελάχιστη ή μηδενική επίδραση στην καταλυτική του δράση. Αφού λοιπόν, το ένζυμο εμφανίζει καταλυτική δράση συνήθως μόνο σε μία ιοντική κατάσταση, βγαίνει το συμπέρασμα ότι το ενεργό κέντρο του δεν περιέχει συνήθως περισσότερες από μία ίδιες ιονιζόμενες ομάδες. Η αλλαγή του pH επιδρά και στην πρωτεϊνική δομή του ενζύμου με αποτέλεσμα την τοπική μεταβολή της δομής του ενεργού κέντρου ή την καταστροφή όλης της δομής του ενζύμου ή τη μεταβολή της τάσης σύνδεσης-διάστασης των υπομονάδων του ενζύμου (όταν έχει τεταρτοταγή δομή). Όλα τα ανωτέρω επιδρούν στη σύνδεση του ενεργού κέντρου με το υπόστρωμα ή τον ενεργοποιητή ή το συνένζυμο, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της κινητικής της όλης αντίδρασης και της ταχύτητας. Επομένως το pH μεταβάλλει, για κάποιο από τους πιο πάνω λόγους, την κινητική του ενζυμικού συστήματος και κατά συνέπεια την ταχύτητα της όλης ενζυμικής αντίδρασης. Το διάγραμμα της δραστηριότητας του ενζύμου σε συνάρτηση με το pH συνήθως έχει τη μορφή κωδωνοειδούς καμπύλης (Cook & Cleland, 2007).

Γενικά το pH επιδρά τόσο στη K_m (αφού μεταβάλλει τις σταθερές ταχύτητας k_1 και k_{-1} της ημιαντίδρασης $E+S \leftrightarrow ES$ και συνεπώς και το $K_m=k_{-1}/k_1$), όσο και στη V_{max} , (αφού μεταβάλλει τη σταθερά ταχύτητας k_2 της αντίδρασης $ES \rightarrow E+P$ και τη (pK_s) σταθερά ιονισμού του ES).

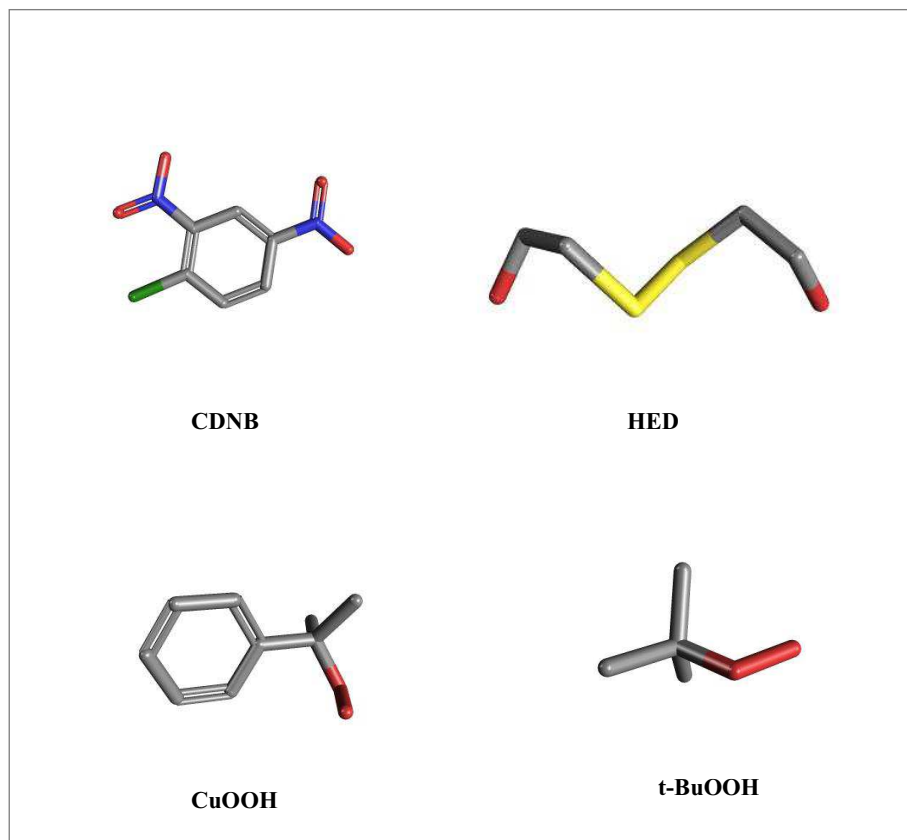
Η θεωρητική προσέγγιση της επίδρασης του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης βρίσκει εφαρμογή στον πειραματικό προσδιορισμό για το άριστο pH δράσης του ενζύμου AtuGST4. Μελετήθηκε η επίδραση του pH στην κινητική παράμετρο V_{max} (παράγραφο 5.2.5). ενώ το εύρος του pH που εξετάστηκε ήταν από 5,2 έως 8,5. Στο Σχήμα 4.5. παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της V_{max} σε συνάρτηση με το pH. Όπως φαίνεται και στο σχήμα το βέλτιστο pH δράσης του AtuGST4 βρίσκεται στην περιοχή του 8. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιοχή του βέλτιστου pH δράσης διαφέρει ανάμεσα στις πρωτεΐνες ακόμη και της ίδιας οικογένειας, το ένζυμο AtuGST4 φαίνεται να βρίσκεται ανάμεσα στη βέλτιστη περιοχή pH των ενζύμων GST (pH 7-7,5) και στη βέλτιστη περιοχή δράσης των GPxs που έχει προσδιοριστεί κοντά στην τιμή pH 8,8 (Mills, 1958).



ΣΧΗΜΑ 4.5. Εξάρτηση της κινητικής παραμέτρου V_{max} του ενζύμου AtuGST4 από το pH. Οι μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα GSH και CDNB.

4.3.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς του ενζύμου *AtuGST4* για τα επιλεγμένα υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), υδροϋπεροξειδίου του κουμηνίου (CuOOH), τ-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίου (t-BuOOH) και 2,2-διθειοδιαιθανόλη (HED). Οι χημικές δομές των υποστρωμάτων που εξεταστήκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.6. Για το υπόστρωμα CDNB οι κινητικές ιδιότητες του ένζυμου μελετηθήκαν σε μεγάλο εύρος τιμών pH: από 6,5 έως 8,3.

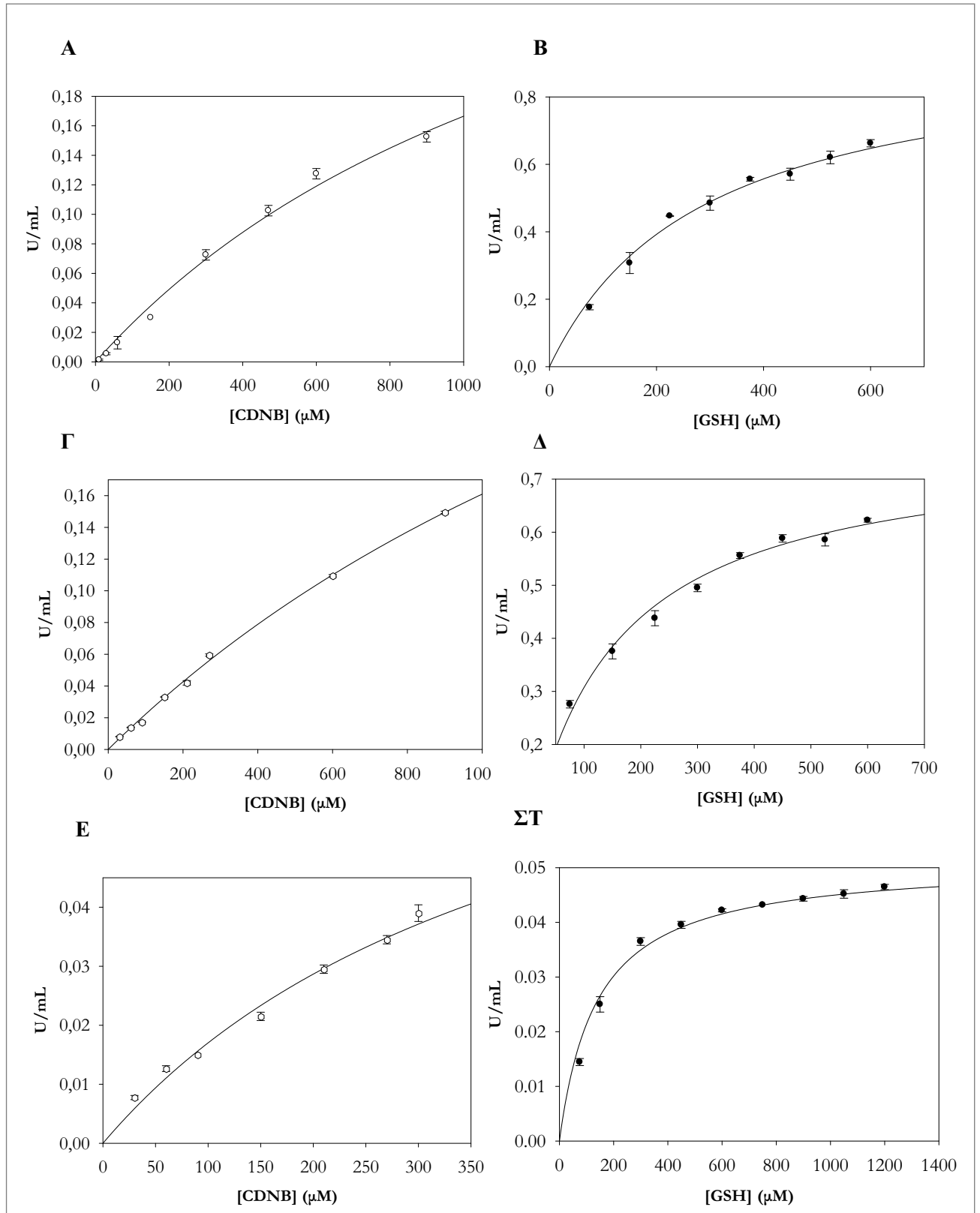


ΣΧΗΜΑ 4.6. Συντακτικοί τύποι των υποστρωμάτων CDNB, CuOOH, t-BuOOH και HED που χρησιμοποιήθηκαν στην κινητική μελέτη του ένζυμου *AtuGST4*.

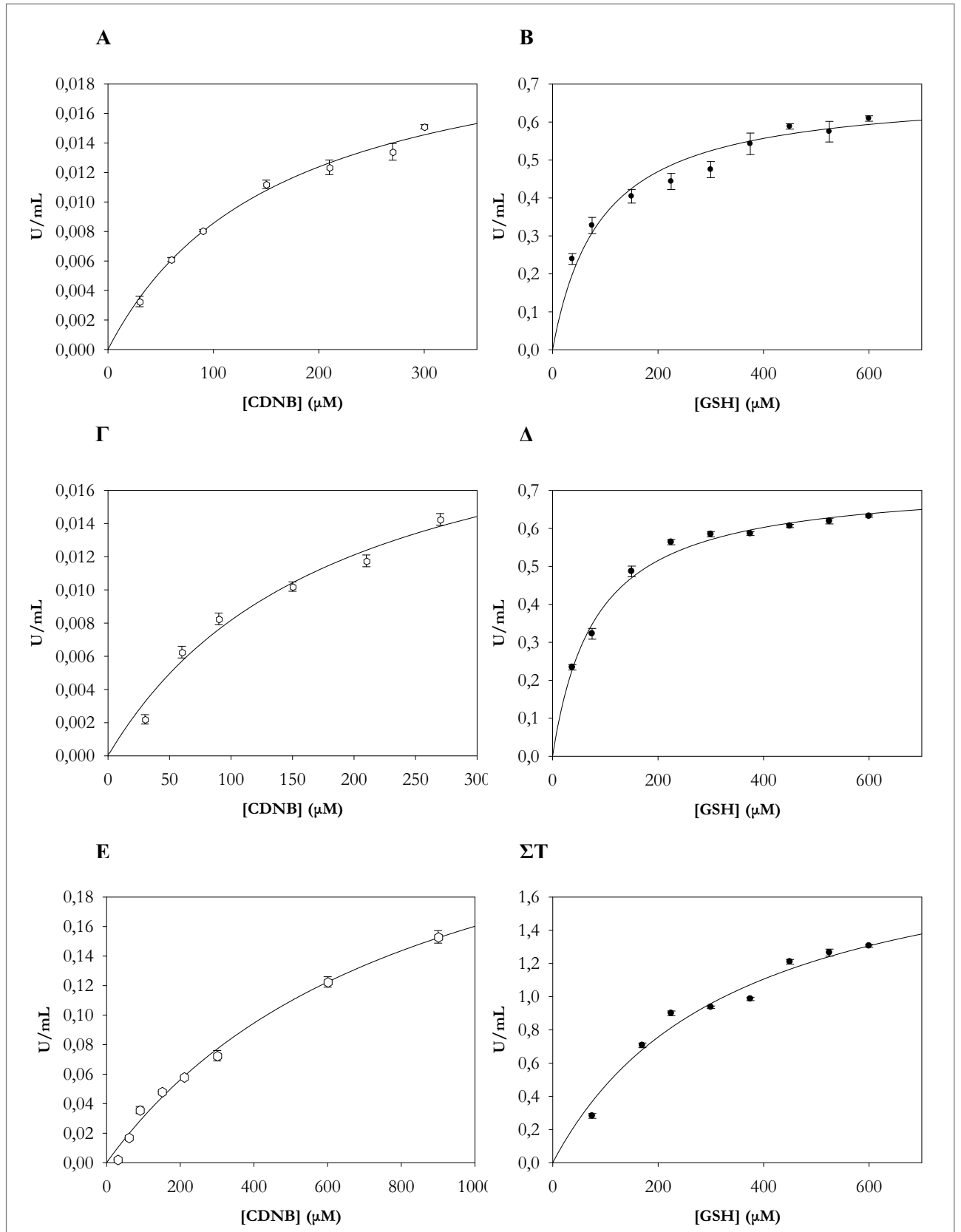
Ο σκοπός της κινητικής μελέτης ήταν να εξετάσουμε την κινητική συμπεριφορά του ένζυμου ως προς το υπόστρωμα CDNB σε διαφορετικές τιμές pH λαμβάνοντας υπόψη ότι το βέλτιστο pH δράσης του ένζυμου βρίσκεται κοντά στην περιοχή 8 (παράγραφος 4.3.2), γεγονός όχι ιδιαίτερα σύνηθες για τα ένζυμα GST τα οποία εμφανίζουν βέλτιστη περιοχή pH στο 7-7,5. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, υπολογισμός των κινητικών σταθερών K_m και k_{cat} για τα υπομελέτη υποστρώματα (Πίνακες 4.3, 4.4). Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του *AtuGST4* έναντι αυτών των υποστρωμάτων περιγράφονται

στις παραγράφους 2.4.19.1. (για το CDNB), 2.4.19.2. (για τα t-BuOOH και CuOOH) και 2.4.19.3. (για το HED). Οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν παρουσιάζουν την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από τις μεταβολές στη συγκέντρωση των υποστρωμάτων (Σχήματα 4.7 και 4.8 για το CDNB, Σχήμα 4.9 για το CuOOH, Σχήμα 4.10 για το t-BuOOH και Σχήμα 4.11 για το HED).

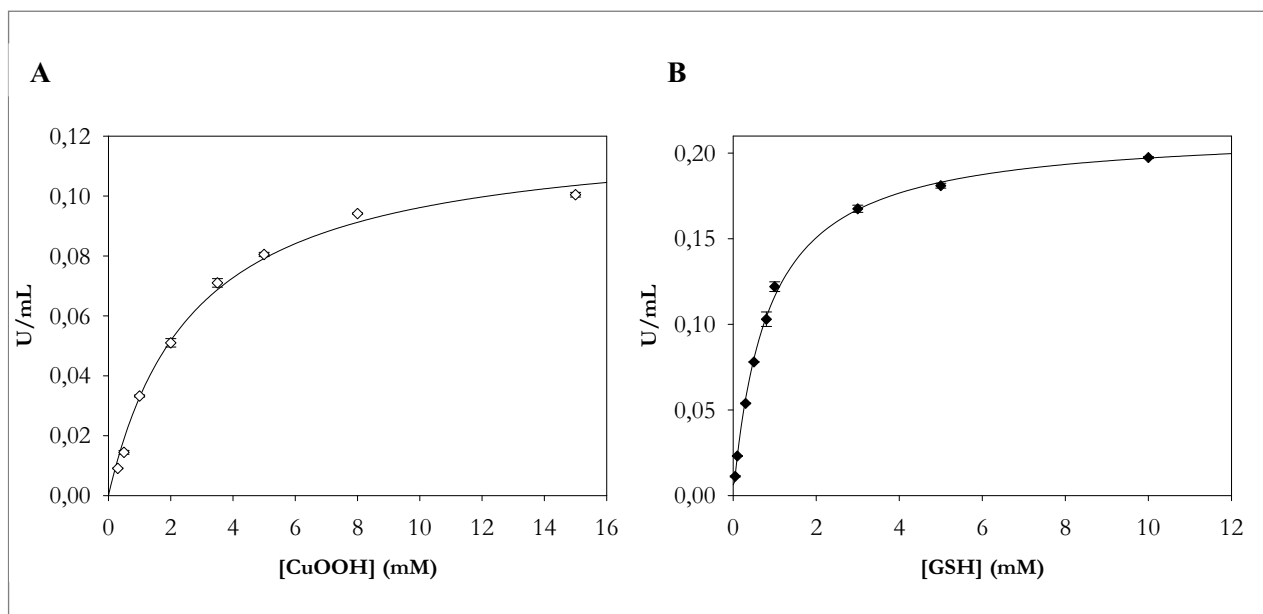
Η κινητική ανάλυση του ενζύμου δείχνει ότι οι μικρότερες τιμές K_m και συγχρόνως οι μεγαλύτερες τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) για το υπόστρωμα CDNB εμφανίζονται για τις τιμές pH 7,6 και 7,9. Ανάμεσα στα υπόλοιπα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη του ενζύμου *AtuGST4* (fluorodifen, CuOOH, t-BuOOH και HED) οι τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) για τα υπεροξειδία CuOOH και t-BuOOH είναι σημαντικά υψηλότερες. Αναλυτικότερα, η τιμή της k_{cat}/K_m για το υπόστρωμα CuOOH είναι 8,314-φορές υψηλότερη συγκριτικά με το CDNB ενώ όταν χρησιμοποιείται το GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα η τιμή της σταθερής εξειδίκευσης αυξάνεται κατά 2.118-φορές (Πίνακες 4.3. και 4.4.). Όσον αφορά το υπόστρωμα HED εμφανίζει συνολικά τις χαμηλότερες τιμές κινητικών σταθερών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υπό μελετη υποστρώματα.



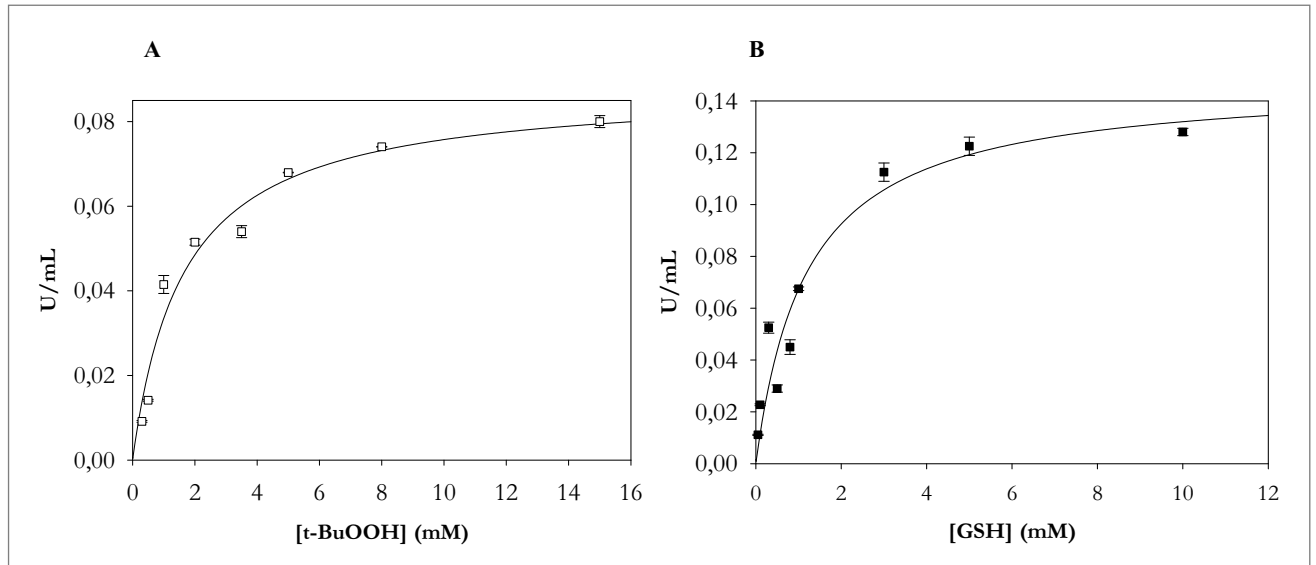
ΣΧΗΜΑ 4.7. Α. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 6,5. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (20-900 μM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). Β. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 6,5. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η GSH (50-600 μM), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Γ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 6,8. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (20-900 μM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). Δ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 6,8. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η GSH (50-600 μM), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Ε. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,2. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (25-300 μM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). ΣΤ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,2. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (50-1200 μM), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM).



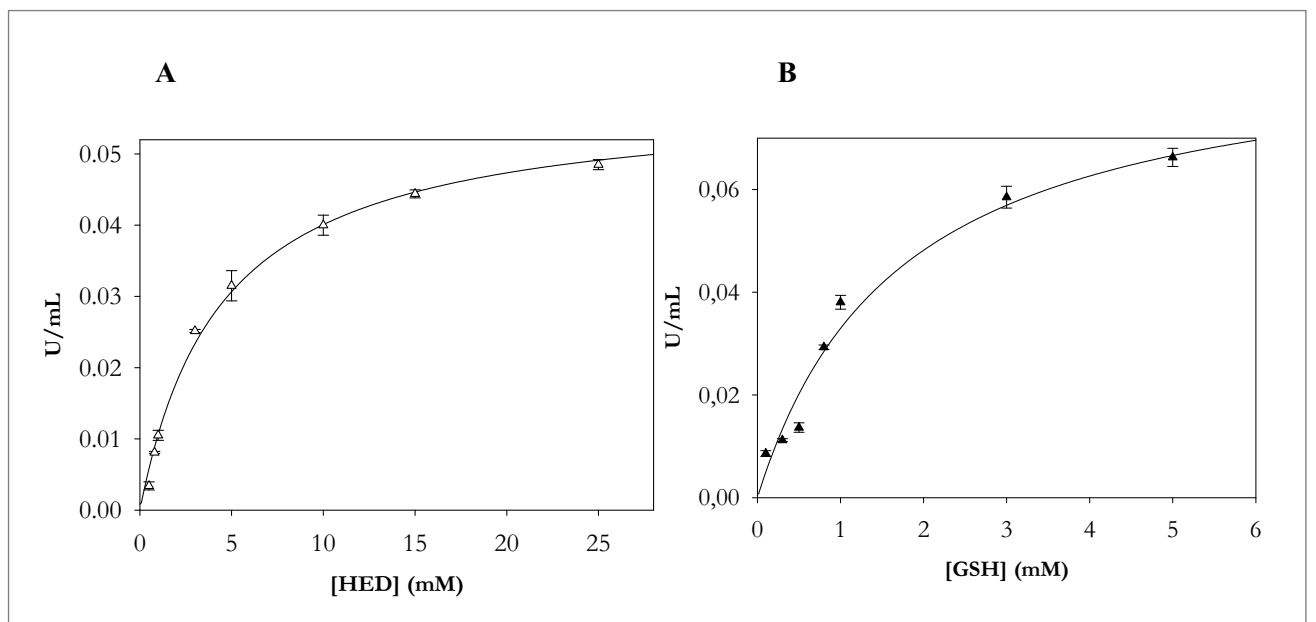
ΣΧΗΜΑ 4.8. Α. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,6. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (20-300 μ M) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). Β. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,6. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (20-600 μ M), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Γ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,9. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (20-270 μ M) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). Δ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,9. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (20-600 μ M), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Ε. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 8,3. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (50-900 μ M) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2,5 mM). ΣΤ. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 8,3. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (50-600 μ M), ενώ το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM).



ΣΧΗΜΑ 4.9. Α. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CuOOH (0,5-15 mM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Β. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (0,1-10 mM), ενώ το CuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1,5 mM).



ΣΧΗΜΑ 4.10. Α. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το t-BuOOH (0,1-15,8 mM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Β. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (0,1-10 mM), ενώ το t-BuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (1,5 mM).



ΣΧΗΜΑ 4.11. Α. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το HED (1-25 mM) ενώ το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (0,5 mM). Β. Γράφημα που παριστάνει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *AtuGST4*. Ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το GSH (0,1-5 mM), ενώ το HED ήταν σε σταθερή συγκέντρωση (2 mM).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3. Κινητικές σταθερές του ενζύμου *AtuGST4* για τα υποστρώματα GSH, fluorodifen, CuOOH, t-BuOOH και HED.

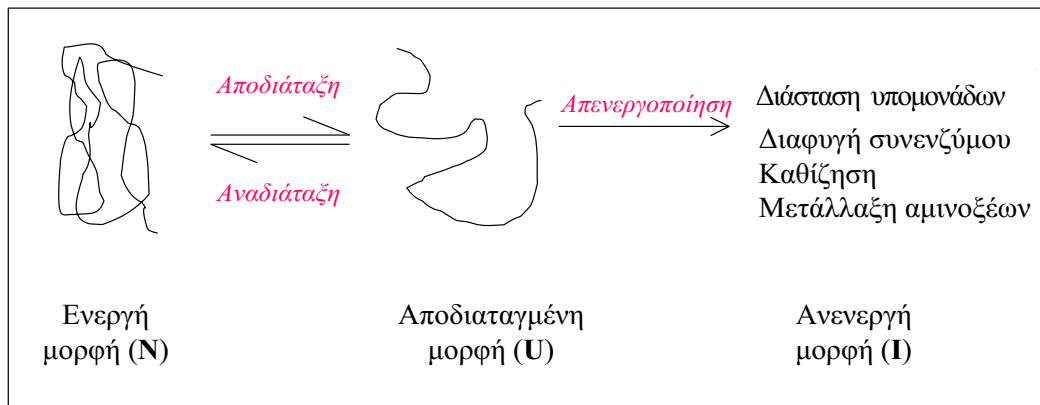
Υπόστρωμα	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1}) ^a	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
GSH	0,3±0,03		
CDNB	1,5±0,09	31,9±0,05	21,4
GSH	0,9±0,07		123,9
CuOOH	2,7±0,21	339,4±6,05	
GSH	1,1±0,05		95,3
t-BuOOH	1,6±0,07	149,7±5,21	
GSH	1,7±0,1		0,6
HED	4,1±0,12	2,4±0,05	

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.4. Κινητικές σταθερές του ενζύμου *AtuGST4* για τα υποστρώματα GSH και CDBN σε εύρος τιμών pH 6,5-8,3.

Υπόστρωμα	pH	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
GSH		6,06	288,87	0,021
CDNB	6,5	0,533	1485,45	0,0005
GSH		4,8	150,11	0,031
CDNB	6,8	0,66	2206,36	0,0003
GSH		4,1	139,05	0,029
CDNB	7,2	0,981	490,94	0,002
GSH		5,4	91,40	0,059
CDNB	7,6	1,132	161,77	0,007
GSH		5,95	81,64	0,073
CDNB	7,9	1,85	206,18	0,009
GSH		3,41	341,87	0,009
CDNB	8,3	0,602	861,41	0,0007

4.3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4* ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ.

Με τον όρο σταθερότητα ορίζεται η ικανότητα ενός ενζύμου να διατηρεί την καταλυτική του δράση όταν επιδέχεται δυσμενείς εξωτερικές επιδράσεις. Η αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής ενός ενζύμου (U) (χωροδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων) είναι το αποτέλεσμα τέτοιων εξωτερικών επιδράσεων και είναι ο βασικός λόγος για τη μείωση της ενεργότητας (Σχήμα 4.12).



ΣΧΗΜΑ 4.12. Μοριακά γεγονότα που οδηγούν σε απώλεια της ενζυμικής δομής και λειτουργίας.

Ωστόσο αυτή η διαδικασία είναι συνήθως αντιστρεπτή και το ένζυμο μπορεί να επανέλθει στην ενεργή του μορφή (N) εφόσον η πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν έχει υποστεί δραστικές χημικές αλλαγές. Αν όμως συμβεί κάποια χημική αλλαγή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα τότε το ένζυμο απενεργοποιείται μη αντιστρεπτά (I). Σε αυτά τα δύο ξεχωριστά φαινόμενα οφείλονται οι δύο διαφορετικοί ορισμοί του όρου σταθερότητα, αυτός της θερμοδυναμικής (ή θερμικής) σταθερότητας και αυτός του χρόνου ζωής (long-term stability). Η θερμοδυναμική σταθερότητα περιγράφει την ικανότητα του ενζύμου να αντιστέκεται στην αποδιάταξη της ενεργής του μορφής ($N \leftrightarrow U$). Με τον όρο χρόνος ζωής περιγράφεται η αντίσταση του ενζύμου σε χημικές μεταβολές που θα το απενεργοποιήσουν ($U \rightarrow I$) (Fagain, 1995). Από το Σχήμα 4.12 είναι φανερό ότι η αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας ενός ενζύμου θα επιφέρει βελτίωση και στο χρόνο ζωής του.

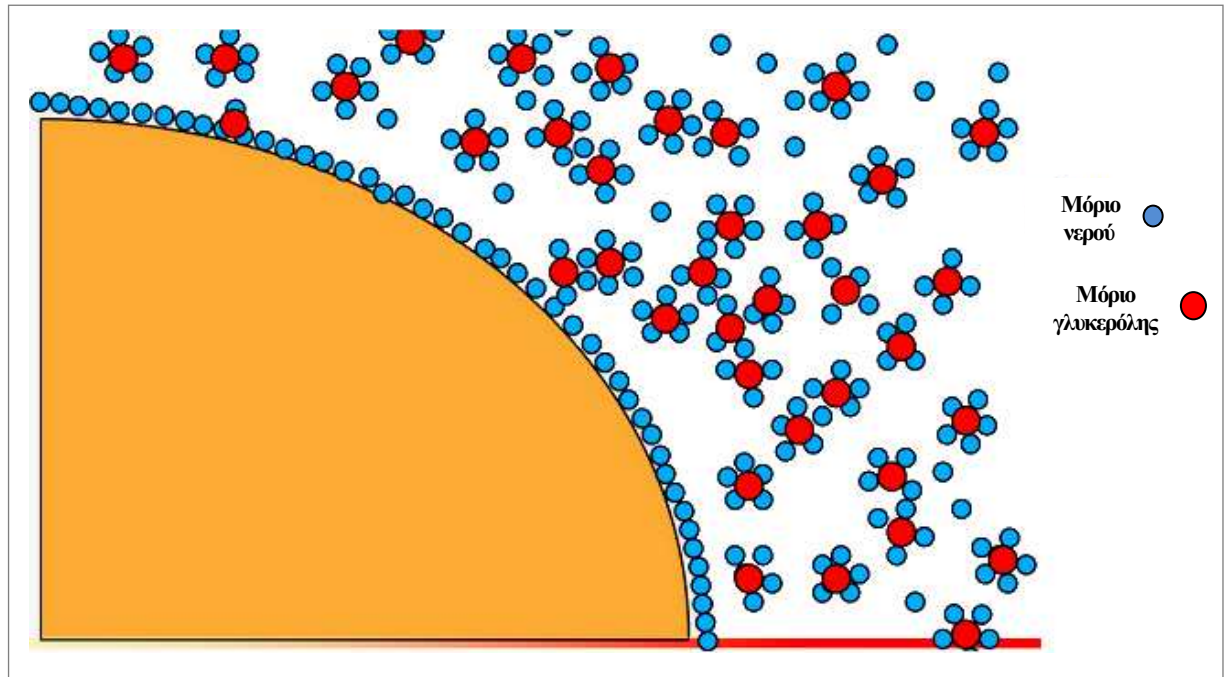
Όταν τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σε υδατικά διαλύματα η σταθερότητά τους μπορεί να αυξηθεί από την παρουσία συγκεκριμένων προσθέτων. Τέτοια πρόσθετα μπορεί να είναι: πολυαλκοόλες, σάκχαρα, αδρανή πολυμερή όπως η πολυαιθυλεν-γλυκόλη, αλλά και φορτισμένα πολυμερή όπως πολυαιθυλενιμίνη και διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη. Η γλουταθειόνη και η γλυκερόλη αποτελούν παράγοντες σταθεροποίησης των ενζύμων GST και γι' αυτό το λόγω

πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης των συγκεκριμένων ουσιών στην σταθερότητα της πρωτεΐνης *AtuGST4*.

Ο τρόπος με τον οποίο η γλυκερόλη δρα και αυξάνει τη σταθερότητα του ενζύμου δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Για τα μικρού μοριακού βάρους αφόρτιστα πρόσθετα (πολυαλκοόλες, σάκχαρα) πιστεύεται ότι αυξάνουν την ενέργεια που χρειάζεται για την ενυδάτωση της αποδιαταγμένης μορφής του ενζύμου. Το αποδιαταγμένο ένζυμο είναι λιγότερο συμπαγές από ότι είναι στην ενεργή του μορφή, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερα μόρια νερού στη σφαίρα επιδιάλυψής του. Η παρουσία των προσθέτων μειώνει τα διαθέσιμα μόρια νερού οπότε η αποδιάταξη του ενζύμου δεν ευνοείται θερμοδυναμικά (Fagain 1995, Xie & Timasheff, 1997).

Αναλυτικότερα με την προσθήκη γλυκερόλης στο ενζυμικό διάλυμα αυξάνεται το χημικό δυναμικό της γλυκερόλης. Η αλληλεπίδραση είναι θερμοδυναμικά μη προτιμητέα, γι' αυτό το λόγω το σύστημα τείνει να μειώσει το φαινόμενο ελαττώνοντας την περιοχή επαφής πρωτεΐνης-γλυκερόλης. Τα περισσότερα από τα μόρια της γλυκερόλης εμποδίζονται να προσδεθούν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η γλυκερόλη με τη σειρά της σχηματίζοντας ι-σχυρούς δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού έχει την ικανότητα να κατευθύνει και να διατάσσει τα μόρια του νερού ώστε να σχηματίζουν ένα υδατικό στρώμα στην επιφάνειά της (Σχήμα 4.13). Με τον τρόπο αυτόν ενισχύεται η προστασία της πρωτεΐνης σε ακτίνα γύρω από την επιφάνεια της με την επιλεκτική ενυδάτωση του ενζύμου (Gekko & Timasheff, 1981).

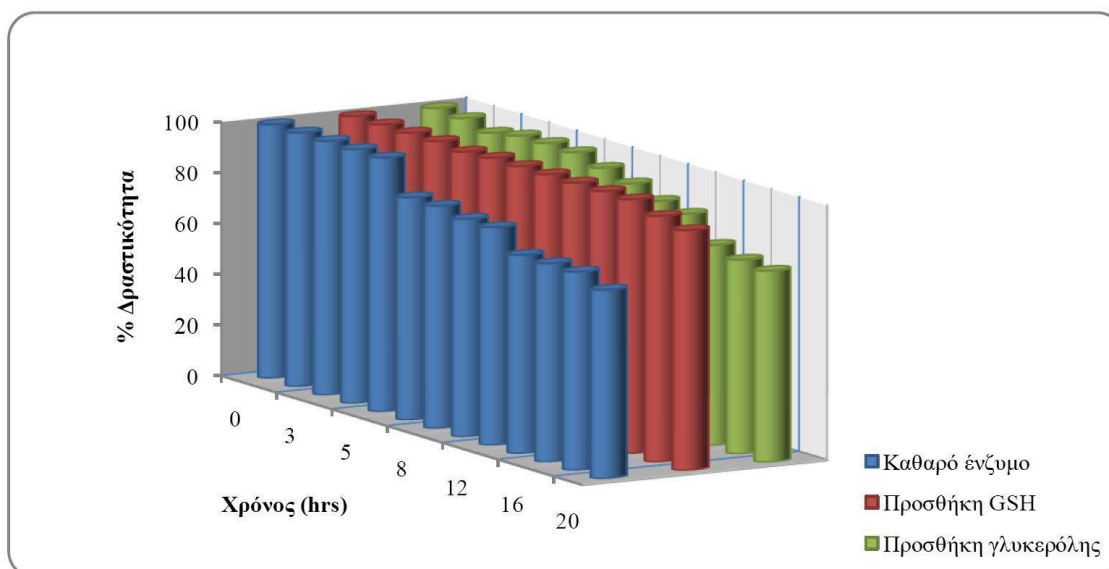
Όσον αφορά τη γλουταθειόνη, η επίδραση αυτή, θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως σε ελάττωση της εντροπίας διαμόρφωσης της αλυσίδας του μη αναδιπλωμένου πολυπεπτιδίου (Schellman 1955, Flory 1956, Poland & Scheraga, 1965, Chan & Dill, 1988). Στην περίπτωση των GSTs, η GSH βοηθά στον σχηματισμό του GSH-GST το οποίο έχει χαμηλότερη ευελιξία και κινητικότητα και με αυτόν τον τρόπο το σταθεροποιεί.



ΣΧΗΜΑ 4.13. Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού τρόπου με τον οποίο τα μόρια της γλυκερόλης και του νερού αλληλεπιδρούν με τη σφαίρα επιδιалύτωσής του ένζυμου *AtuGST4*.

Η σταθερότητα της πρωτεΐνης μελετήθηκε με έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 4.2.6) για χρονικό διάστημα 0-20h σε θερμοκρασία 25°C για τρία ενζυμικά διαλύματα. Το πρώτο περιέχει το καθαρό ένζυμο, το δεύτερο περιέχει γλουταθειόνη και καθαρό ένζυμο και το τρίτο γλυκερόλη και καθαρό ένζυμο (σε αναλογία 1:2).

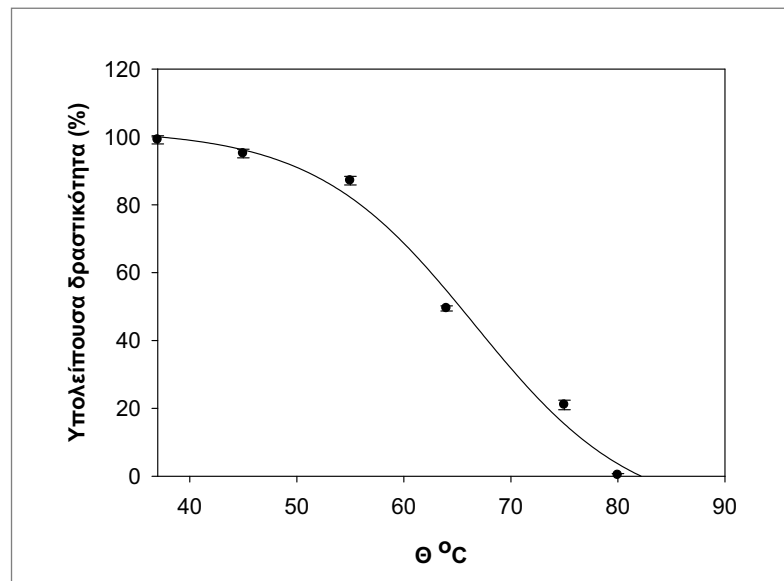
Τα αποτελέσματα παριστάνονται γραφικά στο Σχημα 4.14. Η προσθήκη γλουταθειόνης στο ενζυμικό διάλυμα φαίνεται να αποτελεί άριστο παράγοντα σταθεροποίησης. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα διακριτή μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα παρατηρείται μετά τις 18 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 25°C, ενώ η δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου, χωρίς την προσθήκη οποιασδήποτε ουσίας, αρχίζει να ελαττώνεται αισθητά από την 5η ώρα. Η γλυκερόλη επίσης δρα ως παράγοντας σταθεροποίησης της πρωτεϊνικής δομής, αφού σε σύγκριση με το καθαρό ένζυμο εμφανίζει μικρότερη μείωση στην ενζυμική του δραστηριότητα σχεδόν στον ίδιο χρόνο.



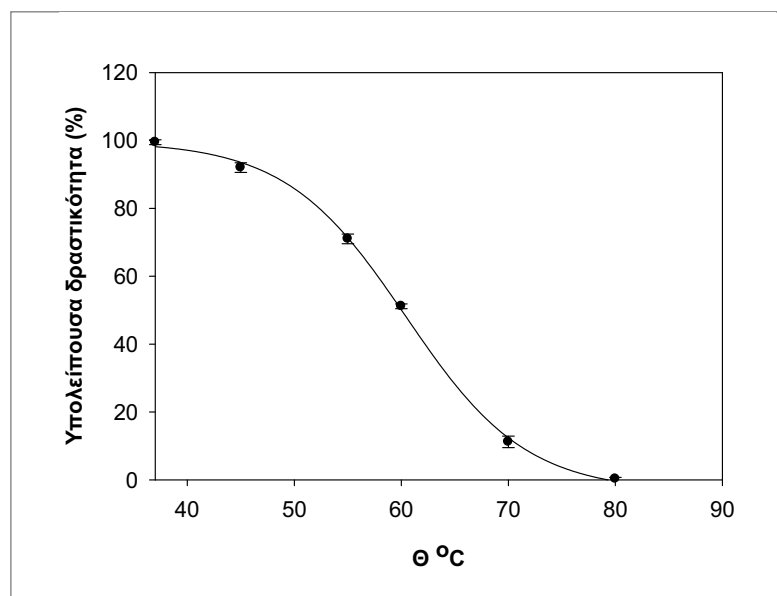
ΣΧΗΜΑ 4.14. Γράφημα που παρουσιάζει την επίδραση του GSH και της γλυκερόλης στη σταθερότητα του ένζυμου *AtuGST4*. Με μπλε ράβδους αναπαρίσταται το καθαρό ένζυμο απουσία πρόσθετων ουσιών, με κόκκινες ράβδους αναπαρίσταται το ενζυμικό διάλυμα με την προσθήκη GSH, ενώ με πράσινες ράβδους αναπαρίσταται το ενζυμικό διάλυμα με την προσθήκη γλυκερόλης.

4.3.5. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Η θερμική σταθερότητα του ένζυμου *AtuGST4* μελετήθηκε με σκοπό να κατασκευαστούν οι καμπύλες θερμικής αδρανοποίησης του ένζυμου και να προσδιοριστούν οι τιμές T_m της πρωτεΐνης (ως T_m ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο χάνει το 50% της αρχικής του δραστηριότητας). Οι πειραματικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 37-80 °C σε δυο διαφορετικές τιμές pH 7,6 και 7,9. Οι τιμές T_m (°C) που προέκυψαν είναι $59,95 \pm 0,93$ °C και $63,33 \pm 1,12$ για τις τιμές pH 7,6 και 7,9 αντιστοίχως. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η κατασκευή των καμπύλων αδρανοποίησης του ένζυμου για την τιμή pH 7,6 (Σχήμα 4.15) και για την τιμή pH 7,9 (Σχήμα 4.16) πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Sigma Plot 11.



ΣΧΗΜΑ 4.15. Η καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,6. Οι υπολείπουσες δραστηριότητες προσδιορίστηκαν ύστερα από επώαση του ενζύμου για 5 min.



ΣΧΗΜΑ 4.16. Η καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου *AtuGST4* σε pH 7,9. Οι υπολείπουσες δραστηριότητες προσδιορίστηκαν ύστερα από επώαση του ενζύμου για 5 min.

4.3.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.

Για τον προσδιορισμό της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται και η ταχύτητα της αντίδρασης, αλλά μονό μέχρι μια ορισμένη τιμή (βέλτιστη θερμοκρασία) πέρα από την οποία παρατηρείται μείωση της ταχύτητας. Ερμηνεία στο συγκεκριμένο φαινόμενο μπορεί να δοθεί, αν δεχτούμε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει δύο ανεξάρτητες διεργασίες την καταλυόμενη αντίδραση και τη θερμική μετουσίωση του ενζύμου. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, (π.χ μέχρι 30°C), η μετουσίωση των περισσότερων ενζύμων πραγματοποιείται με πολύ αργό ρυθμό και επομένως στην πράξη δεν επιδρά στην ταχύτητα τη αντίδρασης. Γι' αυτό το λόγο, σε χαμηλές θερμοκρασίες οι ενζυμικές αντιδράσεις επηρεάζονται από την αύξηση της θερμοκρασίας κατά τον ίδιο τρόπο όπως και οι συνηθισμένες χημικές αντιδράσεις.

Ο νομός του Arrhenius που περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης εκφράζεται με την εξίσωση που ακολουθεί:

$$\ln V_{\max} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4.1)$$

όπου V_{\max} η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol·K), T η απόλυτη θερμοκρασία (K) και A η σταθερά Arrhenius ή παράγοντας συχνότητας. Κατασκευάζοντας το διάγραμμα του $\ln V_{\max}$ σε συνάρτηση με το $1/T$, από την κλίση της ευθείας ($-E_a/R$) που προκύπτει σύμφωνα με την εξίσωση (4.1), μπορούμε να υπολογίσουμε την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης, η οποία θεωρείται σταθερή και ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία για ένα ορισμένο, όχι μεγάλο διάστημα θερμοκρασιών (Μουμτζής Ι.Α., 1994).

Μια χημική αντίδραση μετατροπής ενός υποστρώματος S σε ένα προϊόν P λαμβάνει χώρα μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης S^\ddagger που έχει υψηλότερη ελεύθερη ενέργεια από ότι το S ή το P .



Κατά την πορεία μιας αντίδρασης η μεταβατική κατάσταση, λόγω της υψηλής ελεύθερης ενέργειας, είναι η πλέον σπάνια καταλαμβανόμενη διαμόρφωση. Η ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης κατά Gibbs, που συμβολίζεται με ΔG^\ddagger είναι ίση με τη διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της μεταβατικής κατάστασης και του υποστρώματος:

$$\Delta G^\ddagger = G_{S^\ddagger} - G_S \quad (4.3)$$

Η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του S^\ddagger , η οποία εξαρτάται από τη ΔG^\ddagger , γιατί βρίσκεται σε ισορροπία με το S οπότε ισχύουν οι παρακάτω αντιδράσεις:

$$[S]^\ddagger = [S]e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (4.4)$$

$$V = v[S]^\ddagger = (kT/h)[S]e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (4.5)$$

Στην εξίσωση 4.5, k είναι η σταθερά του Boltzmann και h είναι η σταθερά του Planck. Η τιμή του kT/h στους 25°C είναι $6,2 \times 10^{12}\text{s}^{-1}$.

Εισάγοντας και τις μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας της αντίδρασης, με τη βοήθεια της εξίσωσης του Eyring (Fan et al., 2000), η εξάρτηση της σταθεράς κατάλυσης (k_{cat}) από τη θερμοκρασία δίδεται από την εξίσωση :

$$\ln \frac{k_{cat}}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (4.6)$$

Όπου k η σταθερά του Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{J}\cdot\text{K}^{-1}$), h η σταθερά του Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$), ΔS^\ddagger η μεταβολή της εντροπίας ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), ΔH^\ddagger η μεταβολή της ενθαλπίας ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8,314 \text{J/mol}\cdot\text{K}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (K). Διαπιστώνουμε ότι μείωση της ΔH^\ddagger και αύξηση της ΔS^\ddagger μπορούν να επιδράσουν αυξάνοντας την τιμή του αριθμού μετατροπής, και σε περιπτώσεις που η θερμοκρασία μειώνεται η πρώτη έχει μεγαλύτερη βαρύτητα. Η μείωση της ενθαλπίας συνοδεύεται από μια αναπόφευκτη μείωση της ΔS^\ddagger .

Η εξάρτηση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου από τη θερμοκρασία μελετήθηκε για διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας επώασης του μίγματος αντίδρασης, έτσι ώστε να καθοριστεί η βέλτιστη. Το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο μελετήθηκε η δραστηριότητα του *AtuGST4* είναι από 0 έως 55°C, το οποίο ελέγχθηκε για δυο διαφορετικά υποστρώματα τα CDNB και CuOOH.

Αφού υπολογίστηκαν οι τιμές της V_{\max} κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα Arrhenius $\ln V_{\max} - 1/T$ (σχήμα 4.17). Η κλίση των ευθειών αυτών ισούται, σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius με $(-E_a/R)$. Οπότε από τις ευθείες των διαγραμμάτων του Σχήματος 4.17 υπολογίστηκαν οι τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης για τα δυο υποστρώματα (Πίνακας 4.5). Συγκρίνοντας τα δύο καταλυτικά συστήματα παρατηρούμε ότι για το υπόστρωμα CuOOH η ενέργεια ενεργοποίησης είναι υποτριπλάσια συγκριτικά με αυτή που υπολογίζεται για το υπόστρωμα CDNB. Γενικά μικρότερες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης υποδηλώνουν ότι η αντίδραση πραγματοποιείται ευκολότερα (Γιαννακουδάκης Δ.Α, 1993). Δομικά η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης επιτυγχάνεται με τη μείωση ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων που πρέπει να διασπαστούν για να γίνει η αντίδραση, και κατά συνέπεια με την εμφάνιση πιο εύκαμπτης δομής. Αυτή η αυξημένη ευκαμψία με τη σειρά της οδηγεί στην ύπαρξη πολλών πιθανών διαμορφώσεων ενζύμου-υποστρώματος.

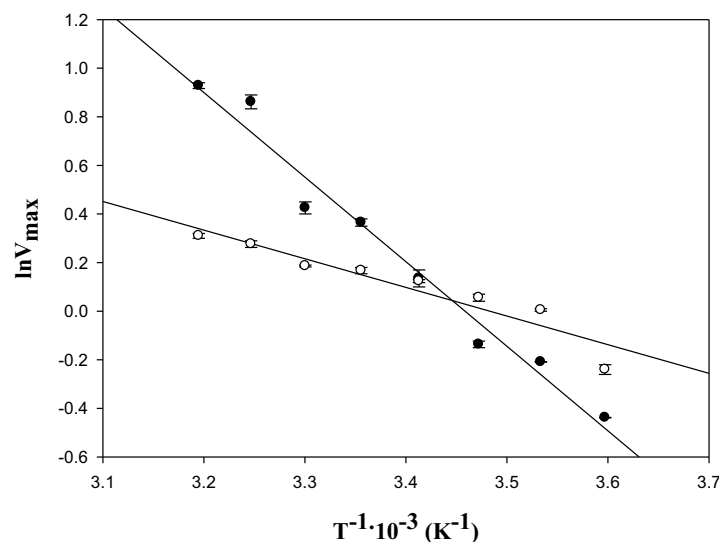
Τα πειραματικά αποτελέσματα για την επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά k_{cat} για το υπόστρωμα CDNB και CuOOH επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια της εξίσωσης του Eyring και παρουσιάζονται με τη γραφική παράσταση του λογαρίθμου της σταθεράς κατάλυσης προς την απόλυτη θερμοκρασία (k_{cat}/T) έναντι του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας (Σχήμα 4.18). Οι τιμές της μεταβολής της ενθαλπίας, της ενέργειας ενεργοποίησης και της μεταβολής της εντροπίας για το ένζυμο *AtuGST4* παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.5. Οι τιμές E_a , ΔH^\ddagger και ΔS^\ddagger του ενζύμου *AtuGST4* για τα υποστρώματα CDNB και CuOOH.

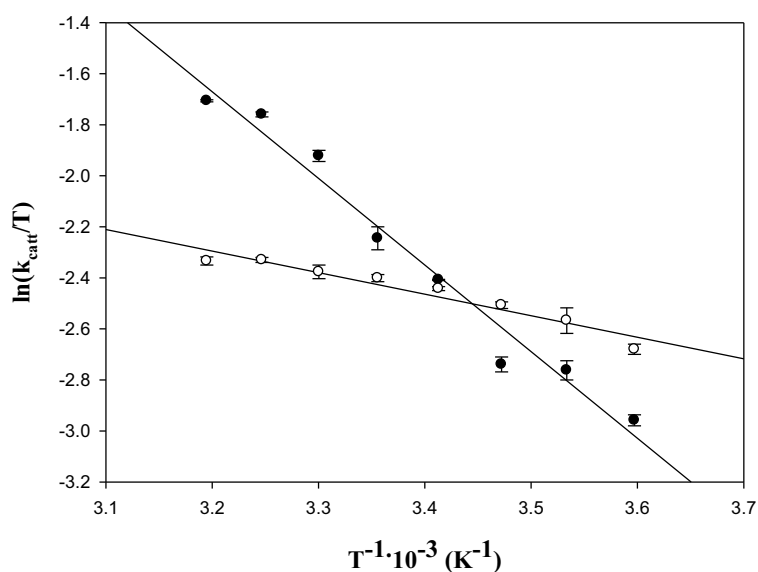
	E_a (KJ/mol)	ΔS^\ddagger (KJ/mol·K)	ΔH^\ddagger (KJ/mol)
Υπόστρωμα			
CDNB	28,35	-0,12	14,71
CuOOH	9,9	-0,2	22,2

Η ΔS^\ddagger δηλώνει την αταξία του συστήματος. Η τιμή και το πρόσημο του ΔS^\ddagger μας παρέχει πληροφορίες για τη φύση των ενεργοποιημένων συμπλόκων. Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές ΔS^\ddagger συμπεριλαμβανομένης και μιας αναστρέψιμης δομικής ανακατάταξης της πρωτεΐνης μετά η κατά τη διάρκεια δέσμευσης του υποστρώματος. Άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην εντροπία είναι ο προσανατολισμός των υποστρωμάτων στην μεταβατική κατάσταση σε σχέση με τα αδέσμευτα μόρια, η σχετική υδροφοβικότητα του υποστρώματος και της πρωτεΐνης, η καθαρή μεταβολή στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ υποστρώματος και ένζυμου (Laidler & Bunting, 1973, Fromm, 1975, Jencks, 1969). Θα μπορούσε επομένως να ειπωθεί, ότι η διαφορά στις τιμές της ΔS^\ddagger που παρατηρείται για τα υποστρώματα CuOOH και CDNB ενδεχομένως να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης και των δυο υποστρωμάτων και πιθανώς σε δομικές ανακατατάξεις της πρωτεΐνης.

Για το υπόστρωμα CDNB η τιμή της E_a είναι σχεδόν τριπλάσια συγκριτικά με τη τιμή της E_a για το υπόστρωμα CuOOH. Οι συγκεκριμένες τιμές σε συνδυασμό με τη διαφορά στις τιμές της ΔH^\ddagger υποδηλώνουν ότι η ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης για το υπόστρωμα CDNB εμφανίζει ισχυρότερη εξάρτηση από τη θερμοκρασία (Lonhienne et al., 2000) σε σύγκριση με την ταχύτητα της αντίδρασης με το υπεροξειδίο CuOOH.



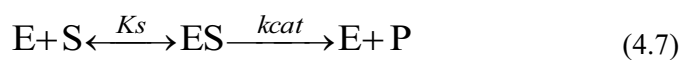
ΣΧΗΜΑ 4.17. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα του ενζύμου *AtuGST4*. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν και επεξεργαστήκαν σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius (εξίσωση 3.5).



ΣΧΗΜΑ 4.18. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα του ενζύμου *AtuGST4*. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν και επεξεργαστήκαν σύμφωνα με την εξίσωση του Eyring (εξίσωση 3.5).

Η μείωση ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων που πρέπει να διασπαστούν για να γίνει η αντίδραση και που παρατηρείται για το υπόστρωμα CuOOH σε σχέση με το CDNB, οδηγεί σε μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης. Δομικά αυτό ερμηνεύεται με την εμφάνιση πιο εύκαμπτης δομής. Αυτή η αυξημένη ευκαμψία με τη σειρά της οδηγεί στην ύπαρξη πολλών πιθανών διαμορφώσεων ενζύμου-υποστρώματος (Lonhienne et al., 2000) και κατά συνέπεια σε αυξημένη εντροπία του ES συμπλόκου στην περίπτωση του CuOOH.

Η εξίσωση Arrhenius (παράγραφος 4.3.6) που χρησιμοποιείται στη θερμοδυναμική των ενζυμικών αντιδράσεων δεν λαμβάνει υπόψη την περιοριστική επίδραση των μοριακών κινήσεων του μέσου στον ρυθμό ταχύτητας μιας συγκεκριμένης αντίδρασης. Η θεωρία του Kramers (Kramers, 1940) χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την επίδραση του ιξώδους στην συμπεριφορά των ενζυμικών αντιδράσεων όταν εμπλέκονται δομικές ανακατατάξεις των πρωτεϊνών (Jacob & Schmid, 1999): σε μια ενζυμική αντίδραση (εξίσωση 4.7) στην οποία το υπόστρωμα S συνδέεται με το ένζυμο E για την απόδοση του προϊόντος P κατά την αντίδραση:



Ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος (k_{cat}) αναστέλλεται από την τριβή που αναπτύσσεται μεταξύ του διαλύματος και της πρωτεΐνης γεγονός που σημαίνει ότι η τριβή αυξάνει την απαιτούμενη ενεργεία ενεργοποίησης των αντιδρώντων (Lavalette et al., 1999). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η τριβή είναι συνάρτηση του ιξώδους η , η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης k εξαρτάται γραμμικά από το ιξώδες (Jacob & Schmid, 1999) όπως προκύπτει από την εξίσωση που ακολουθεί:

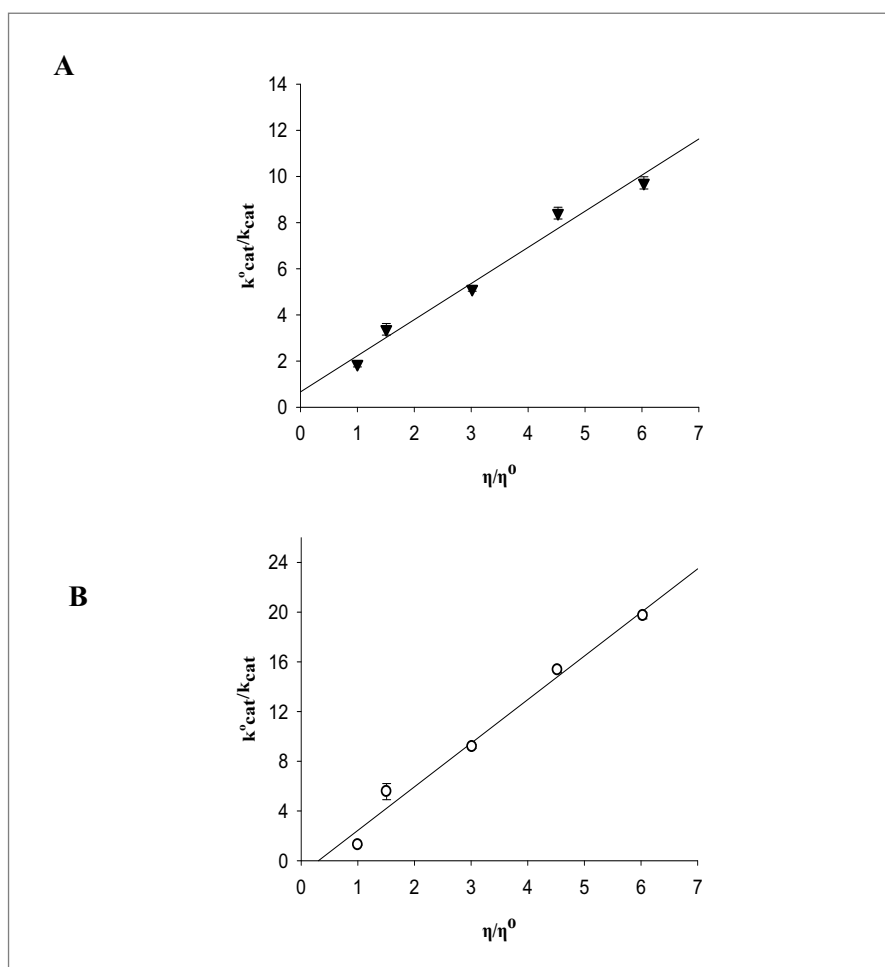
$$k = \eta - 1 \exp(-\Delta U / RT) \quad (4.8)$$

οπού k είναι η κινητική σταθερά k_{cat} , η το ιξώδες του διαλύματος, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol·K), T η απόλυτη θερμοκρασία (K) και ΔU η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας. Σε μια δεδομένη θερμοκρασία, αύξηση στο ιξώδες προκαλεί αύξηση στο ΔU .

Για να εκτιμηθεί κατά ποσό η καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων αναστέλλεται από το ιξώδες, όπως προβλέπεται από την εξίσωση του Kramer, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} για το υπόστρωμα CDNB στους 37 °C αυξάνοντας σταδιακά τις τιμές ιξώδους του διαλύματος. Αυτό επιτεύχθηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης που προσετέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα των αντιδράσεων (Wolf et al, 1985). Σχεδιαστήκαν οι γραφικές παραστάσεις $k_{\text{cat}}^{\circ}/k_{\text{cat}}$ έναντι του η/η° (όπου k_{cat}° είναι η τιμή για ιξώδες η° , όπου $^{\circ}$ οι τιμές απουσία γλυκερόλης) με κλίση ίση με τη μονάδα όταν η απελευθέρωση του προϊόντος αποτελεί το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης ή με κλίση σχεδόν ίση με το μηδέν αν κάποια μη ελεγχόμενη από τη διάχυση δομική ανακατάταξη της πρωτεΐνης αποτελεί το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης (Sampson & Knowles, 1992, Labrou et al., 2001).

Το καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης (Rate Determining Step, RDS) αποτελεί το πιο αργό στάδιο του καταλυτικού μηχανισμού που τελικά καθορίζει και την ολική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Προκειμένου να βρεθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης, μελετήθηκε η επίδραση του ιξώδους στις κινητικές σταθερές της πρωτεΐνης *AtuGST4*. Τα υποστρώματα CDNB και CuOOH χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς του υπό εξέταση ένζυμου σε θερμοκρασία 37°C προσθέτοντας στο ρυθμιστικό διάλυμα των αντιδράσεων διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

Η γραφική παράσταση k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του η/η^0 για τα υποστρώματα CDNB (Σχήμα 4.19 A) και CuOOH (Σχήμα 4.19 B) έδωσε γραφική εξάρτηση του ιξώδους με κλίσεις $0,151\pm 0,003$ και $0,339\pm 0,008$ αντιστοίχως. Συμπεραίνουμε επομένως, ότι για τα δυο υποστρώματα, το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με τις δομικές ανακατατάξεις της πρωτεΐνης (Johnson et al., 1993, Labrou et al., 2001).



ΣΧΗΜΑ 4.19. Η γραφική παράσταση της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} . Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CDNB (A) και το CuOOH (B). Παρουσιάζεται η εξάρτηση του k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του η/η^0 . Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε pH 7,9 στους 37 °C για το υπόστρωμα CDNB και σε pH 7,5 στους 30 °C για το υπόστρωμα CuOOH χρησιμοποιώντας ως παράγοντα αύξησης του ιξώδους τη γλυκερόλη.

4.3.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΗΣ *AtuGST4* ΜΕ ΤΟ S-P-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛΟ-GSH.

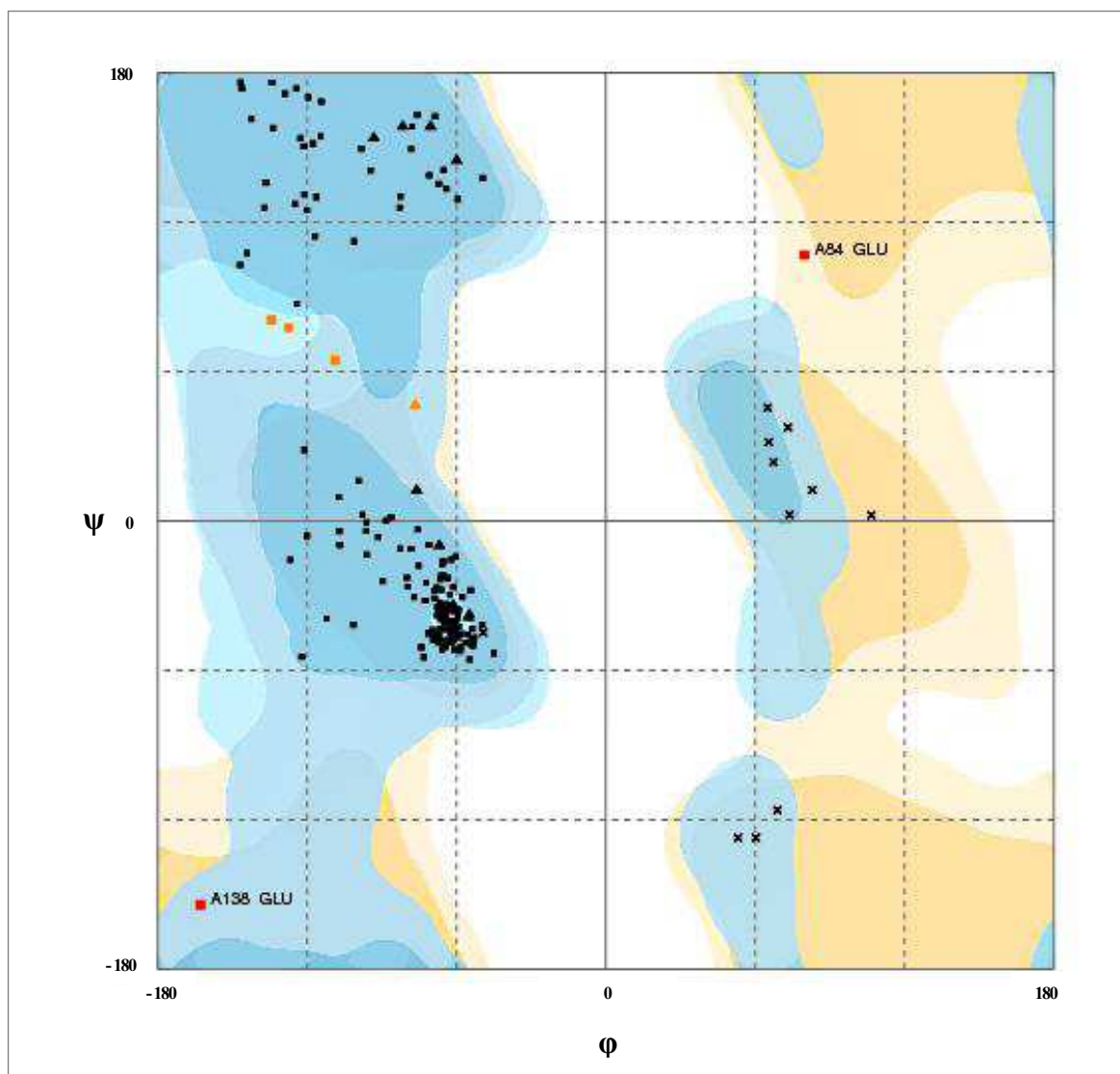
4.3.9.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ.

4.3.9.1.1. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ RAMACHANDRAN.

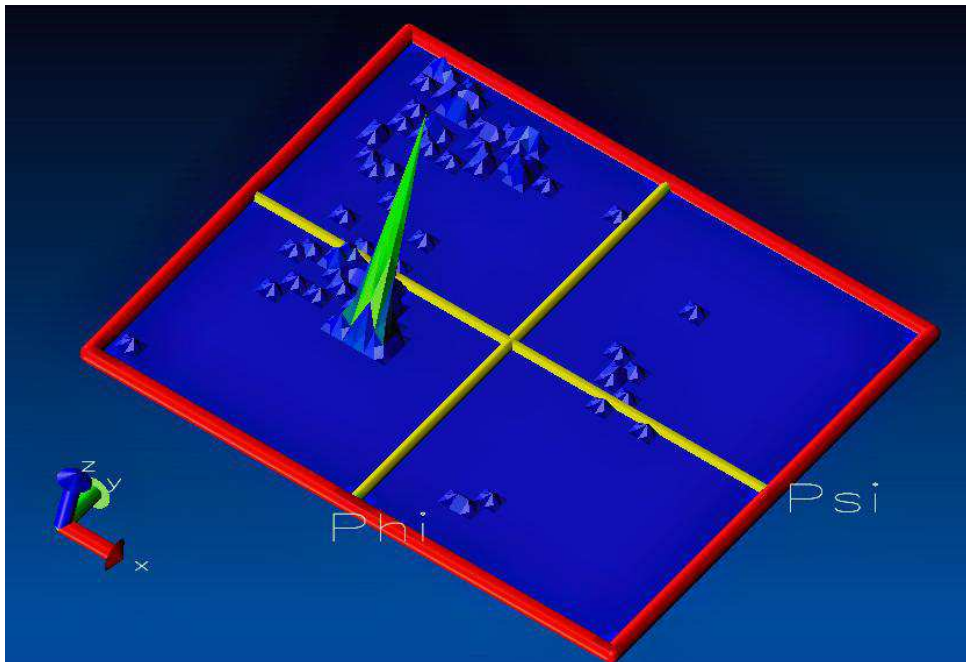
Το σύμπλοκο του ενζύμου *AtuGST4* με το S-p-νιτροφαινυλ-GSH μελετήθηκε μέσω κρυσταλλογραφίας περίθλασης ακτίνων-X και προσδιορίστηκε η κρυσταλλική του δομή με ανάλυση τάξης μεγέθους 1.4 Å. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για τη δημιουργία και ανάπτυξη κρυστάλλων του συμπλόκου βασίζεται στη μέθοδο της διάχυσης ατμών με κρεμάμενη σταγόνα (hanging drop vapor diffusion method). Η κρυσταλλογραφία πραγματοποιήθηκε από το Κέντρο Βιοτεχνολογίας του Τούρκου στη Φινλανδία από την ομάδα του Δρ. Α. Παπαγεωργίου.

Το διάγραμμα Ramachandran μας δείχνει τις επιτρεπτές στερεοδιατάξεις/διαμορφώσεις συνδυασμού φ & ψ δίδρων γωνιών σε μια πεπτιδική ακολουθία. Παρόλο που κανείς θα περίμενε ότι οι μεγαλύτερες πλευρικές αλυσίδες θα κατέληγαν σε περισσότερους περιορισμούς και συνεπώς θα εμφανίζονταν σε μια μικρότερη επιτρεπτή περιοχή στον χάρτη, αυτό πρακτικά δεν συμβαίνει. Από τη στερεοχημεία της πρωτεΐνης όπως αυτή παρουσιάζεται στον χάρτη και τις τιμές των δίδρων γωνιών της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων, το μοντέλο φαίνεται να έχει πολύ καλή γεωμετρία αφού όλα τα μεγέθη βρίσκονται μέσα στα επιτρεπόμενα όρια (Πίνακας 6.6). Στο Σχήμα 4.20 παρουσιάζεται το διάγραμμα των φ/ψ δίδρων γωνιών της κύριας αλυσίδας (Ramachandran plot) και στο Σχήμα 4.21 ο χάρτης Ramachandran σε τρισδιάστατη απεικόνιση. Το 97,1% των αμινοξικών καταλοίπων βρίσκονται στις ευνοούμενες περιοχές και το υπόλοιπο 2,9% στις επιτρεπόμενες. Οι γλυκίνες έχοντας ένα άτομο υδρογόνου, με μικρότερη ακτίνα van der Waals, εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό περιορισμού και επομένως ένα πολύ περιορισμένο αριθμό πιθανών συνδυασμών ψ και φ. Για παράδειγμα, στο πρώτο και τέταρτο τεταρτημόριο του χάρτη παρουσιάζονται τα 11 από τα 13 αμινοξικά κατάλοιπα γλυκίνων η πλειοψηφία των οποίων δεν εμφανίζεται στην κεντρική περιοχή αλλά στην επιτρεπόμενη και ευρύτερη περιοχή, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα Glu84 και Glu138 τοποθετούνται εκτός των ορίων της επιτρεπόμενης περιοχής. Τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα Ala137, Pro139, Glu169 και Tyr195 βρίσκονται στην επιτρεπόμενη περιοχή (στον χάρτη παριστάνονται ως πορτοκαλί τετράγωνα). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζονται στα όρια της επιτρεπόμενης περιοχής με την ευρύτερη, υποδηλώνουν χαμηλότερη δομική σταθερότητα. Επίσης τα αμινοξέα που βρίσκονται πάνω στους άξονες (συνεχόμενες γραμμές) υποδηλώνουν τα N- και C- τελικά αμινοξέα της υπομονάδας. Η πάνω αριστερή περιοχή

μοιράζεται σε δυο κομμάτια ένα στα αριστερά που περιέχει τα αμινοξέα στα βήτα ελάσματα και ένα στα δεξιά που περιέχει τα αμινοξέα σε τυχαία περιέλιξη αυτής της διαμόρφωσης.



ΣΧΗΜΑ 4.20. Διάγραμμα Ramachandran της υπομονάδας A του ενζύμου AtuGST4. Τα αμινοξικά κατάλοιπα αναπαρίστανται ως κουκίδες. Η γενικά επιτρεπόμενη και κεντρική περιοχή παρουσιάζεται με θαλασσί και μπλε χρώμα αντίστοιχα. Η ευνοϊκή και επιτρεπόμενη περιοχή για τα αμινοξικά κατάλοιπα γλυκίνων παριστάνονται με πορτοκαλί και ροζ χρώμα αντίστοιχα. Επισημαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα Glu84 και Glu138 που εμπίπτουν στην ευρύτερη επιτρεπόμενη περιοχή. Το σχήμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα RAMPAGE (Lovell et al., 2002).



ΣΧΗΜΑ 4.21. Παρουσιάζεται ο χάρτης Ramachandran σε τρισδιάστατη μορφή. Είναι εμφανής η συγκέντρωση των περισσοτέρων αμινοξικών καταλοίπων στο τρίτο τεταρτημόριο του διαγράμματος (α-έλικα) όπου εμφανίζεται η πράσινη κορυφή. Η κατανομή των υπολοίπων αμινοξικών καταλοίπων παρουσιάζεται με διάσπαρτες κορυφές στον ανάγλυφο χάρτη. Η αναπαράσταση του χάρτη Πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα VMD 1.8.6 (Humphrey et al., 1996, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

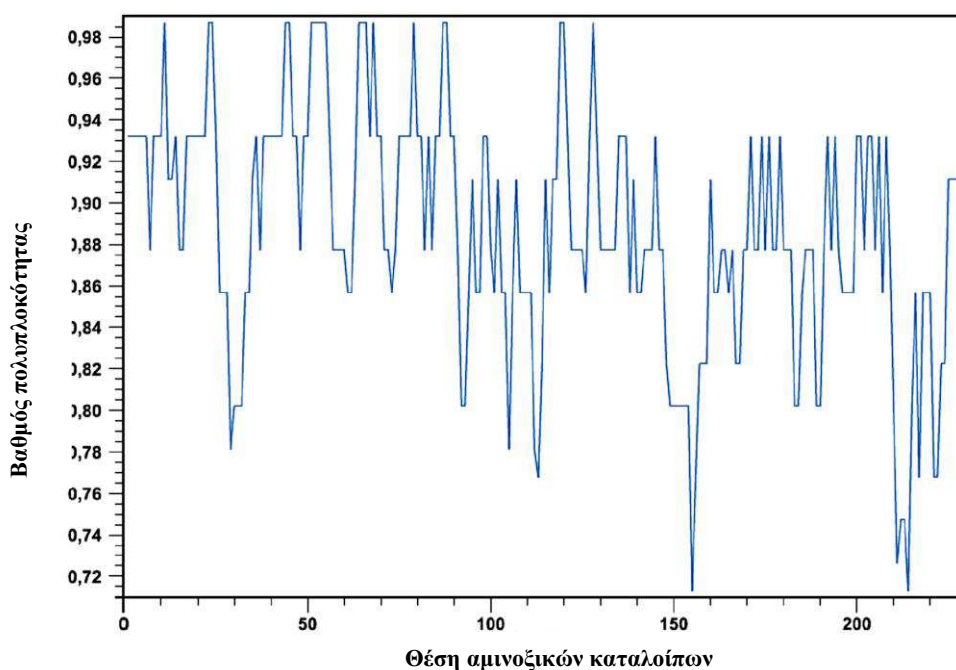
4.3.9.1.2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4*.

Οι διαφορετικές ιδιότητες των αμινοξικών καταλοίπων σε μια αλληλουχία φαίνεται να κωδικοποιούν δομικές πληροφορίες για την πρωτεΐνη (Yang & Yang, 2008). Διαφορετικοί τρόποι αναδίπλωσης των πρωτεϊνών μπορούν να προσδιοριστούν από τις διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων τους. Η πολυπλοκότητα της ακολουθίας όπως και η υδροφοβικότητα αποτελούν χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που προκύπτουν από το φυσικοχημικό τους προφίλ. Στο σχήμα 4.22 παρουσιάζεται το διάγραμμα του βαθμού πολυπλοκότητας της πρωτεΐνης *AtuGST4*. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Burgin, 2005, Deb-nath & Burgin, 2003, Li & Vitányi, 1997, Sipser, 1997) η εντροπία του Kolmogorov, γνωστή ως K2-εντροπία, χρησιμοποιείται ως ένα μέτρο υπολογισμού της τοπικής πολυπλοκότητας της αμινοξικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας μια σειρά αλγορίθμων (Dünki, 1991). Είναι

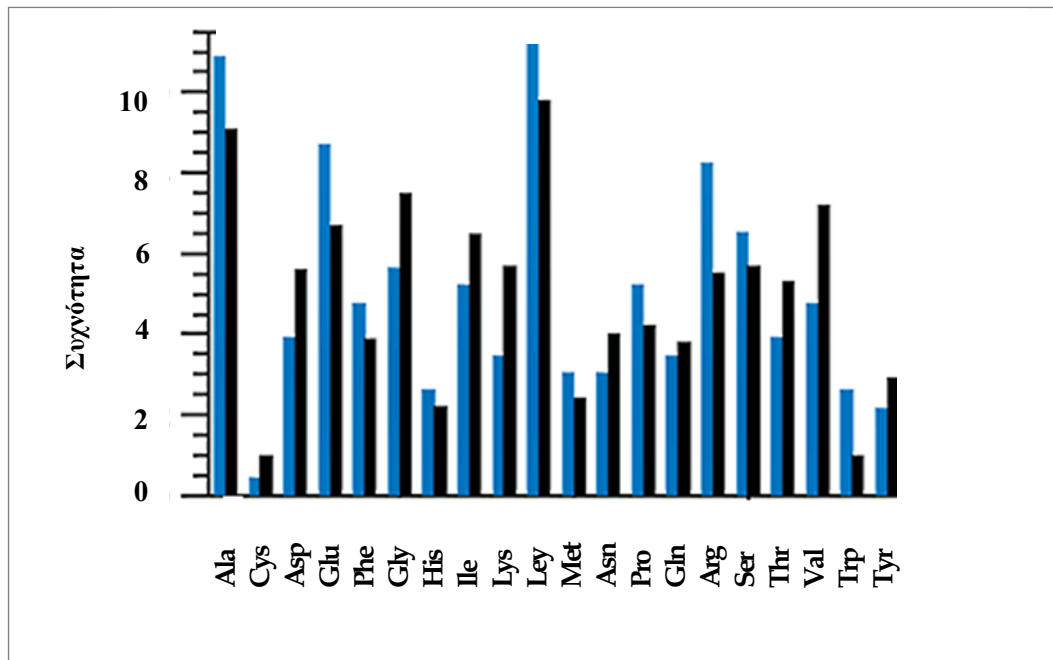
ουσιαστικά η «ποσότητα της έκπληξης» που κρύβει κάθε αμινοξική ακολουθία. Για παράδειγμα μια υψηλά διευθετημένη αμινοξική ακολουθία και εύκολη στην περιγραφή της όπως η « A, A, A, A....., A» έχει μηδενική εντροπία. Μια εντελώς τυχαία ακολουθία έχει τη μεγαλύτερη δυνατή εντροπία (Mitchell, 2009). Η πολυπλοκότητα κάθε αμινοξικού καταλοίπου σε μια ακολουθία σύμφωνα με τη θεωρία Κολμογορον υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$C_i = - \sum_{n=1}^{20} P_i(an) \log_2 P_i(an)$$

που αν ανήκει στο σύνολο των 20 αμινοξέων και P_i η πιθανότητα ενός αμινοξέος να βρίσκεται σε μια θέση. Στο Σχήμα 4.23 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης κάθε αμινοξέος στο σύνολο των καταλοίπων για το ένζυμο *AtuGST4* σε σύγκριση με τις αμινοξικές ακολουθίες όλων των βακτηρίων.

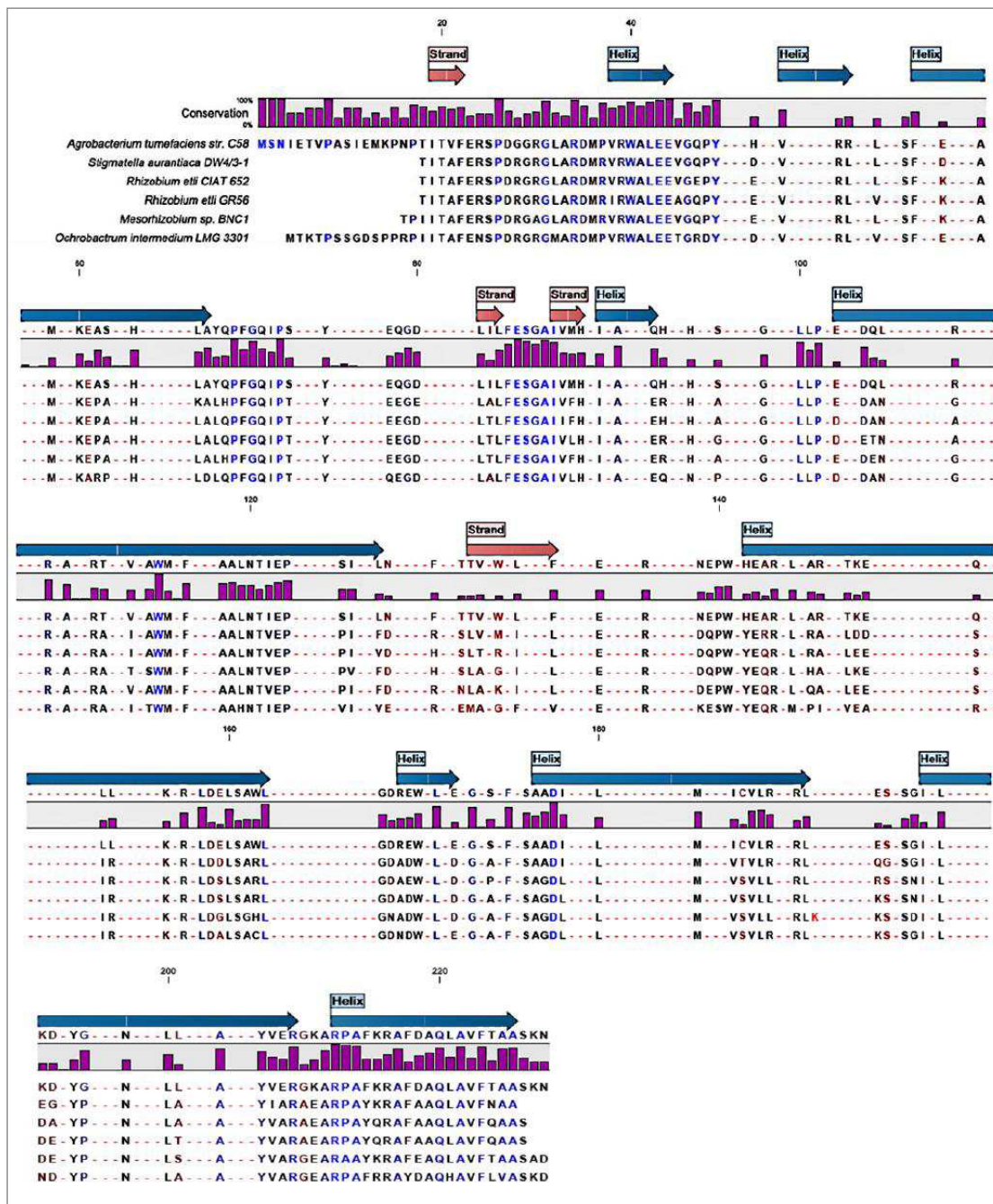


ΣΧΗΜΑ 4.22. Παρουσιάζεται το διάγραμμα του βαθμού τοπικής πολυπλοκότητας κατά μήκος της αμινοξικής του ακολουθίας για το ένζυμο *AtuGST4*. Ο χ άξονας δηλώνει τη θέση των αμινοξικών καταλοίπων, ενώ ο ψ άξονας τον βαθμό πολυπλοκότητας της πρωτεΐνης σύμφωνα με τους Wootton & Federhen, 1993.



ΣΧΗΜΑ 4.23. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης κάθε αμινοξέος στο σύνολο των καταλοίπων για το ένζυμο *AtuGST4* (γαλάζιοι ράβδοι) και για το σύνολο των βακτηρίων (μαύροι ράβδοι).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση πέντε διαφορετικών GSTs με τη δευτεροταγή δομή του *AtuGST4* έγινε ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών (Clustal W, Thompson et al., 1994) του ενζύμου *AtuGST4* και των ενζύμων GSTs από πέντε διαφορετικούς βακτηριακούς οργανισμούς. Η απεικόνιση της ευθυγράμμισης και σύγκρισης των ακολουθιών (Σχήμα 4.24) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CLC Main Workbench 5.

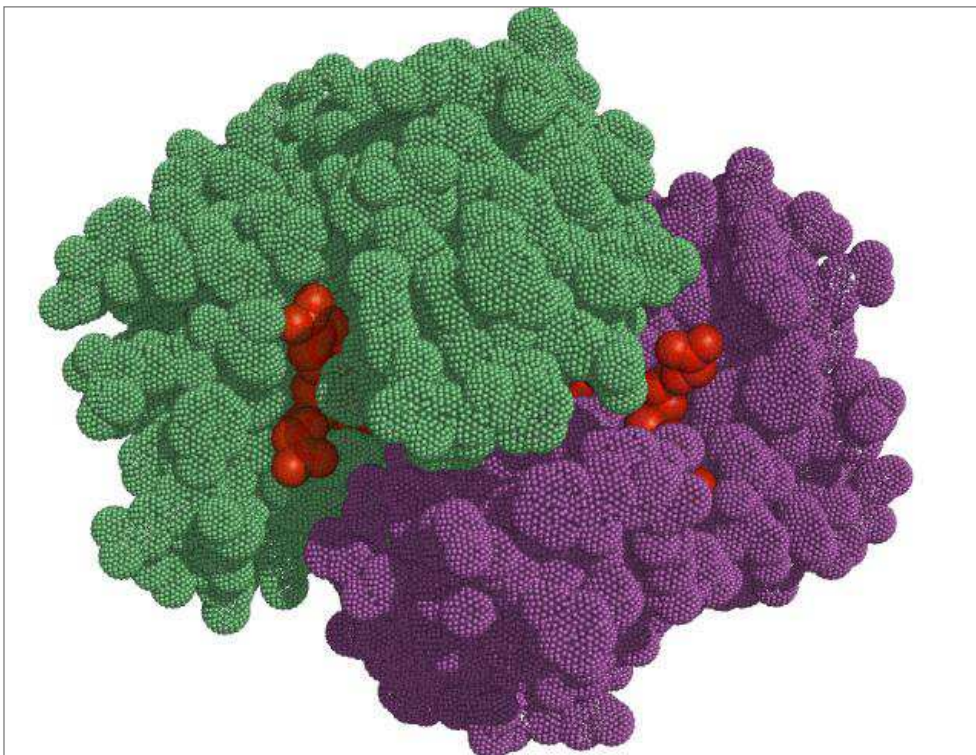


ΣΧΗΜΑ 4.24. Σύγκριση βακτηριακών GSTs με τη δευτεροταγή δομή του *AtuGST4*. Με μπλε βέλη παρουσιάζονται οι α-έλικες και με κόκκινα βέλη τα β-ελάσματα. Παράλληλα παρουσιάζεται με ραβδογράμματα το πόσο συντηρημένα είναι τα αμινοξέα κατά μήκος της ακολουθίας (conservation %). Με τελείες παρουσιάζονται τα μη συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα μεταξύ των ακολουθιών.

4.3.9.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4*.

4.3.9.2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *AtuGST4*.

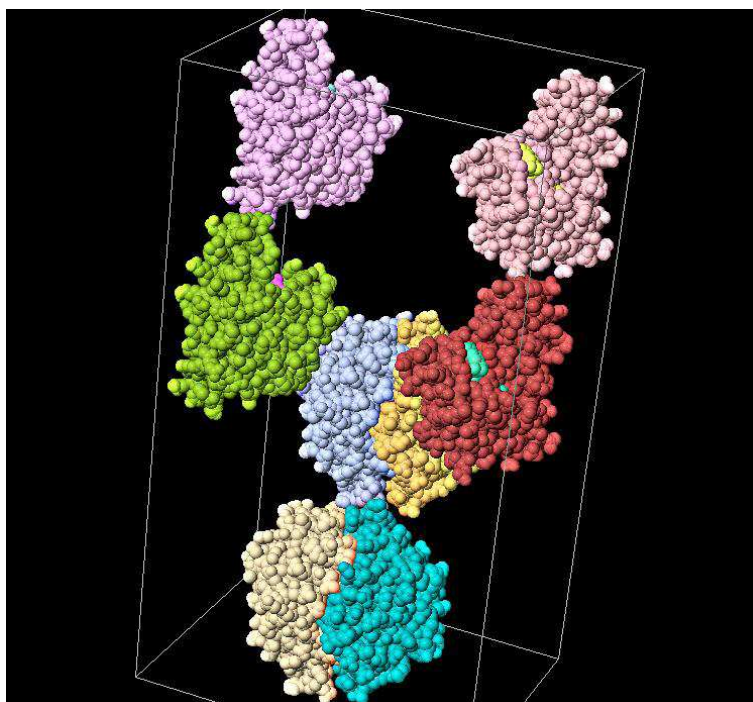
Το συμπλοκή *AtuGST4*:S-p-νιτροφαινυλ-GSH κρυσταλλώνει στην ομάδα συμμετρίας χώρου C2221 και εμφανίζει τέσσερα ομοδιμερή στην ασύμμετρη μονάδα (Σχήμα 4.26). Σε κάθε μονομερές προσδέεται ένα μόριο αναστολέα S-p-νιτροφαινυλ-GSH του οποίου η δομική επιφάνεια είναι $679,8 \text{ \AA}^2$ (Σχήμα 4.25). Επιπλέον, η δομική επιφάνεια της πρωτεΐνης σε κάθε μονομερές προσδιορίστηκε σε $10.805,6 \text{ \AA}^2$. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που αφορούν τη μέτρηση των κρυσταλλογραφικών παραμέτρων και τον προσδιορισμό της ομάδας συμμετρίας χώρου (space group) του συγκεκριμένου κρυστάλλου παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 4.6 και προέκυψαν με τη βοήθεια του προγράμματος PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html, Krissinel & Henrick, 2007).



ΣΧΗΜΑ 4.25. Παρουσίαση του ομοδιμερούς της πρωτεΐνης *AtuGST4*. Με κουκίδες αναπαρίστανται τα δυο μονομερή του ένζυμου, ενώ με κόκκινες σφαίρες τα δυο μόρια του S-p-νιτροφαινυλ-GSH καθένα από τα οποία είναι δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο κάθε μονομερούς. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.6. Αποτελέσματα υπολογισμού κρυσταλλογραφικών παραμέτρων.

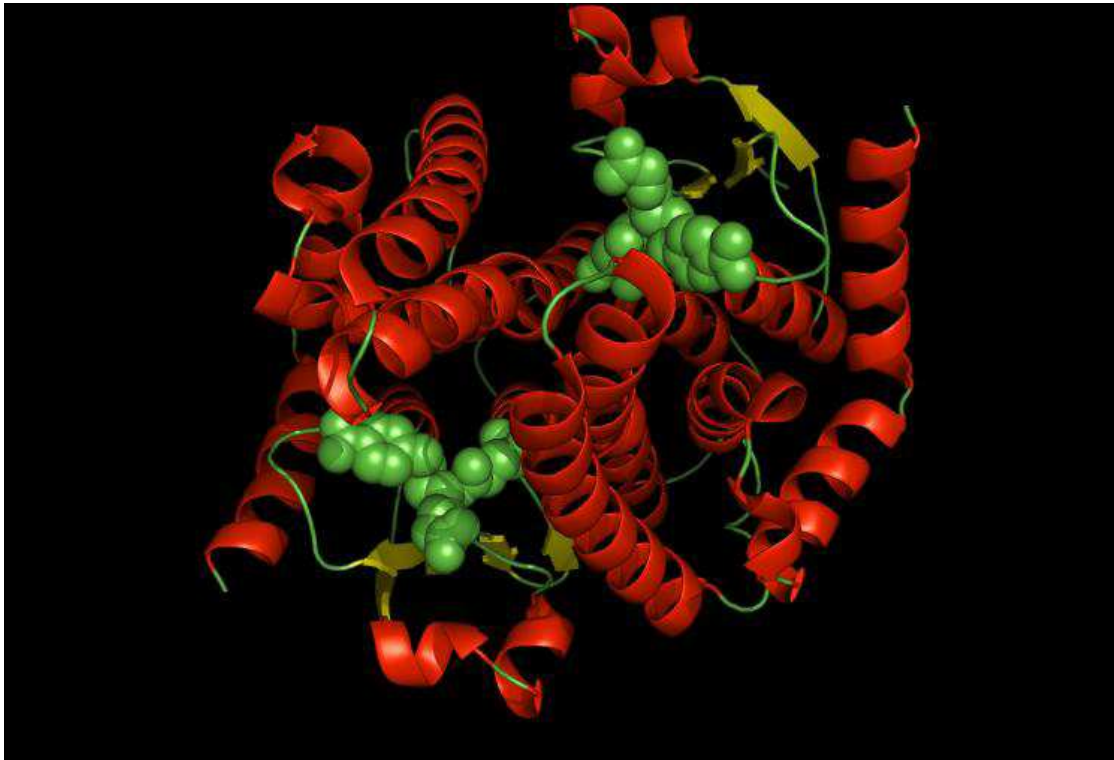
Κρυσταλλογραφικά δεδομένα	
Κρυσταλλικό σύστημα	Τρικλινές
Ομάδα χώρου	$C222_1$
Διαστάσεις κυψελίδας	49,4 x 96,0 x 88,4 Å



ΣΧΗΜΑ 4.26. Αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας του κρυστάλλου της πρωτεΐνης AtuGST4. Παρουσιάζονται τα τέσσερα ομοδιμερή που περιέχονται στην ασύμμετρη μονάδα τα οποία κρυσταλλώνουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου $C222_1$ με τις κρυσταλλογραφικές παραμέτρους που αναφέρονται στον Πίνακα 4.6. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα επεξεργαστήκαν με το πρόγραμμα PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html, Krissinel & Henrick, 2007) ενώ το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα Jmol (<http://www.jmol.org/>).

Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης AtuGST4 αποκαλύπτει σε κάθε μονομερές της πρωτεΐνης διακρίνονται 4 β-επιφάνειες και 9 α-έλικες (Σχήμα 4.27). Επιπρόσθετα, κάθε μονομερές υιοθετεί τη δομή α/β στη N-τελική δομική ενότητα (αμινοξικά κατάλοιπα 1 έως 92) η οποία αποτελείται από συνδυασμούς μοτίβων βαβα. Το πρώτο β-έλασμα (αμινοξικά κατάλοιπα 1 έως 21) συνδέεται μέσω μιας μακριάς, εκτιθέμενης προς την επιφάνεια του διαλυτή λούπας

12 αμινοξέων με την H1 α -έλικα. Στη C-τελική δομική ενότητα υιοθετείται μοτίβο α -έλικας (αμινοξικά κατάλοιπα 104 έως 230).



ΣΧΗΜΑ 4.27. Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του διμερούς *AtuGST4*. Οι α -έλικες παρουσιάζονται ως κόκκινες περιελίξεις, τα β -ελάσματα ως κίτρινα βέλη. Τα μόρια των προσδεμένων αναστολέων του S-p-νιτροφαινυλ-GSH αναπαρίστανται με πράσινες σφαίρες. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

4.3.9.2.2. N-ΤΕΛΙΚΗ ΔΟΜΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ.

Η N-τελική δομική ενότητα αποτελείται από δύο μεγάλες α -έλικες (H1, κατάλοιπα: 34-44, H4, κατάλοιπα 85-95), δυο μικρές α -έλικες (H2, κατάλοιπα: 55-59, H3, κατάλοιπα: 61-66) και β -φύλλα αποτελούμενα από τέσσερα β -ελάσματα: β 1 (κατάλοιπα 17-21), β 2 (κατάλοιπα 49-53), β 3 (κατάλοιπα 75-77) και β 4 (κατάλοιπα 79-82). Τα παραπάνω δομικά στοιχεία διατάσσονται σε ένα βαβααββα μοτίβο στο οποίο το β 3 έλασμα παρατάσσεται αντιπαράλληλα στα υπόλοιπα τρία και με το γειτονικό του β 4 έλασμα συνδέεται με ένα βρόγχο φουρκέτας μήκους δυο αμινοξικών καταλοίπων. Η β -πτυχωτή επιφάνεια καλύπτεται από τις H1 και H4 έλικες οι οποίες τοποθετούνται στην εσωτερική πλευρά προς το κέντρο του διμερούς και τις μικρές α -έλικες H2 και H3 οι οποίες βρίσκονται εκτεθειμένες στην επιφάνεια του διαλυτή.

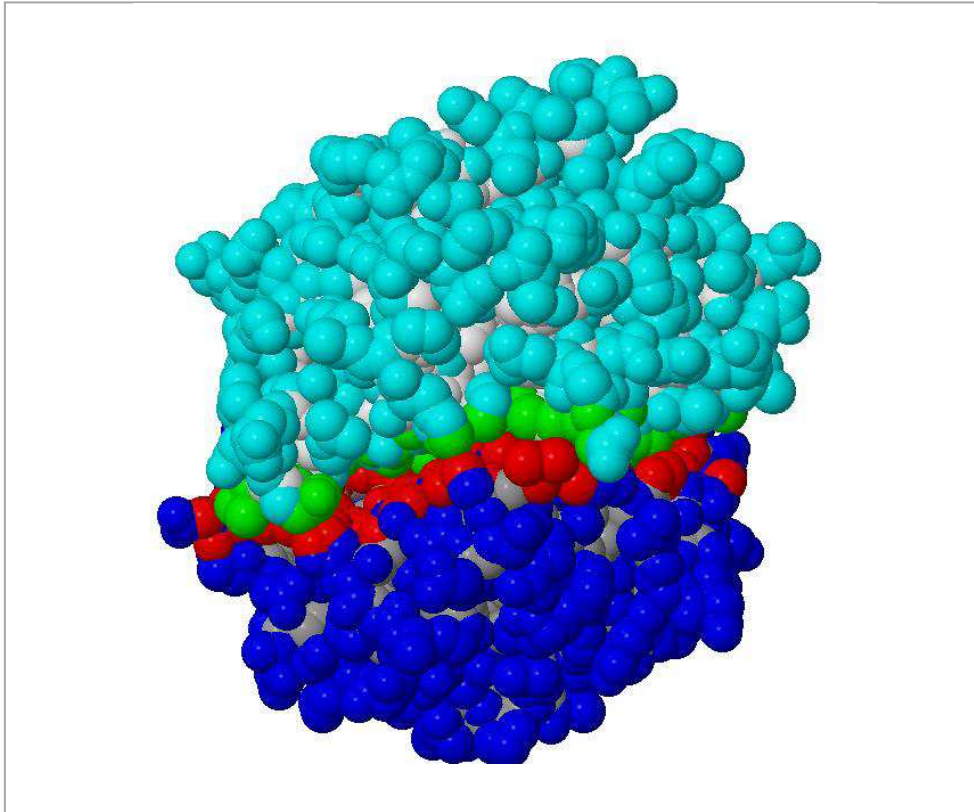
4.3.9.2.3. C-ΤΕΛΙΚΗ ΔΟΜΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ.

Η C-τελική δομική ενότητα εμφανίζει μοτίβο α-έλικας και αποτελείται από έξι αριστερόστροφες α-έλικες (αμινοξικά κατάλοιπα 104 έως 230). Οι α-έλικες H6 (174-189) και H8 (196-207) συνδέονται μεταξύ τους με μια μικρή α-έλικα μήκους τεσσάρων αμινοξικών καταλοίπων (191-194) που βρίσκεται σε ίση απόσταση (ενός αμινοξικού καταλοίπου) και από τις δυο μεγάλες έλικες (H6 και H7). Η H8 έλικα σχηματίζει σχεδόν ορθή γωνία με την H9 (209-230) έλικα ενώ οι α-έλικες H4 (104-134) και H5 (140-162) βρίσκονται σε παράλληλη (up and down) διάταξη. Η H6 α-έλικα εμφανίζεται παράλληλη ως προς το επίπεδο των H4 και H5 ελίκων παρουσιάζοντας μια κλίση με κατεύθυνση προς το κέντρο του διμερούς.

4.3.9.2.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ.

Οι N- και C-τελικές δομικές περιοχές συγκρατούνται μαζί μέσω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των ελίκων H1 και H3 με τις έλικες H6 και H7. Επιπρόσθετα, τμήματα των ελίκων H5 και H6 αλληλεπιδρούν με τα β3 και β4. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κυρίως van der Waals οι οποίες μαζί με τους υδρογονικούς δεσμούς πλευρικών αλυσίδων σταθεροποιούν την C-δομική περιοχή. Πολικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Arg109 (NH1)-Ile81(O), Asn119(ND2)-Glu84(OE1), Thr120(OG1)-Glu84(OE2) και Arg154(NH1)-Phe69(O). Το αμινοξικό κατάλοιπο Glu84, το οποίο συμμετέχει στη διαμόρφωση της G-θέσης αναπτύσσει πολικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Thr120 και Asn119 οι οποίες προσανατολίζουν με τέτοιο τρόπο τη C-δομική περιοχή ώστε να μην μπλοκάρει την είσοδο στην καταλυτική περιοχή G του ενεργού κέντρου.

Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας δύο υπομονάδων μπορεί να είναι υδροφοβικές (δημιουργία υδρόφοβου πυρήνα), ιοντικά ζεύγη/δεσμοί άλατος, δεσμοί (γέφυρες) υδρογόνου και ομοιοπολικοί δεσμοί. Βέβαια αυτές που κυρίως είναι υπεύθυνες για τη συμπληρωματικότητα των επιφανειών επαφής, είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί άλατος/δεσμοί υδρογόνου. Οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μαζί με τις πολικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με τα μόρια του νερού καθώς και την τριτοταγή πρωτεϊνική δομή αποτελούν τους τρεις παράγοντες που καθορίζουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (folding).

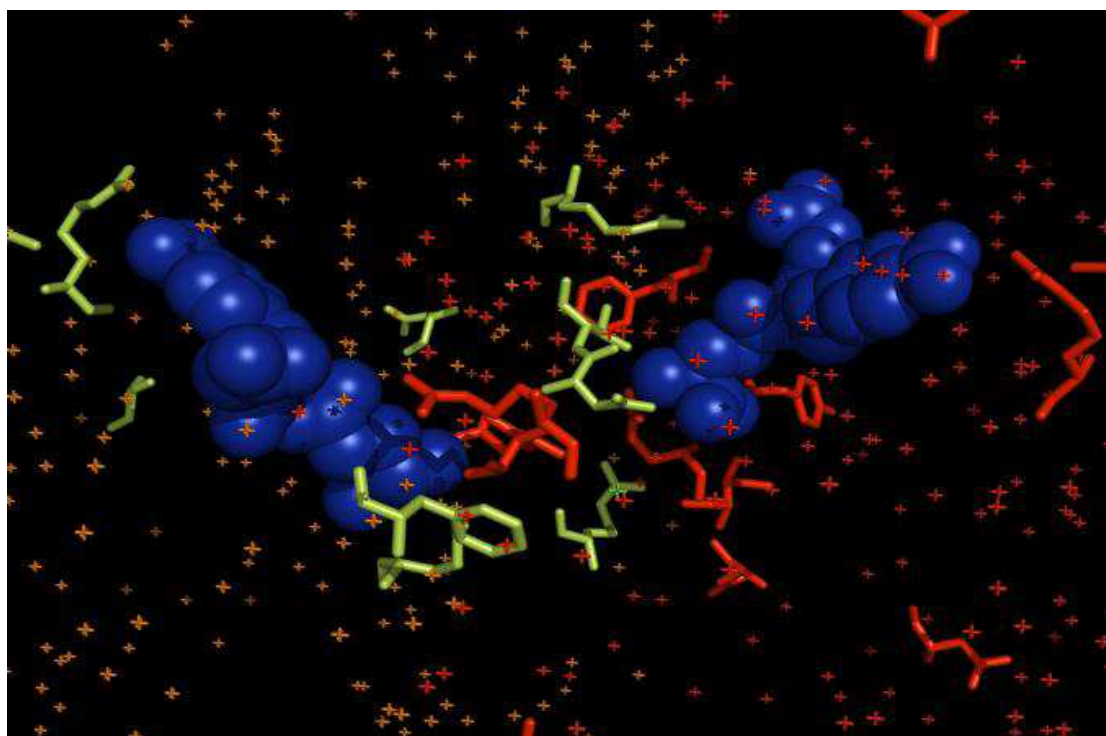


ΣΧΗΜΑ 4.28. Αναπαράσταση του πρωτεϊνικού ομοδιμερούς *AtuGST4*. Παρουσιάζεται το εύρος της κοινής επιφάνειας (κόκκινες και πράσινες σφαίρες) των δυο υπομονάδων (με γαλάζιες σφαίρες η υπομονάδα A και με μπλε σφαίρες η υπομονάδα B). Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα επεξεργαστήκαν με το πρόγραμμα PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html, Krissinel & Henrick, 2007) ενώ το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα Jmol (<http://www.jmol.org/>).

Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας δύο υπομονάδων για την πρωτεΐνη *AtuGST4* παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7 και αναπαριστώνται στο Σχήμα 4.29. Η κοινή επιφάνεια αλληλεπιδράσεων των δύο υπομονάδων (2600 \AA^2) έχει παραπλήσιο μέγεθος με αυτή των θηλαστικών GSTs ($2700\text{-}3000 \text{ \AA}^2$) (Bogos et al, 2003) και συγκρινόμενη με τις ω τάξης GSTs (έως 1960 \AA^2) (Board et al, 2000) εμφανίζει μια ευρεία διεπιφάνεια (Σχήμα 4.29). Η γέφυρα άλατος που δημιουργείται μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων της Arg136 και της Asp216 ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης στην κοινή επιφάνεια του διμερούς, συμμετέχει στη διαμόρφωση του ανοιχτού V σχήματος του διμερούς.

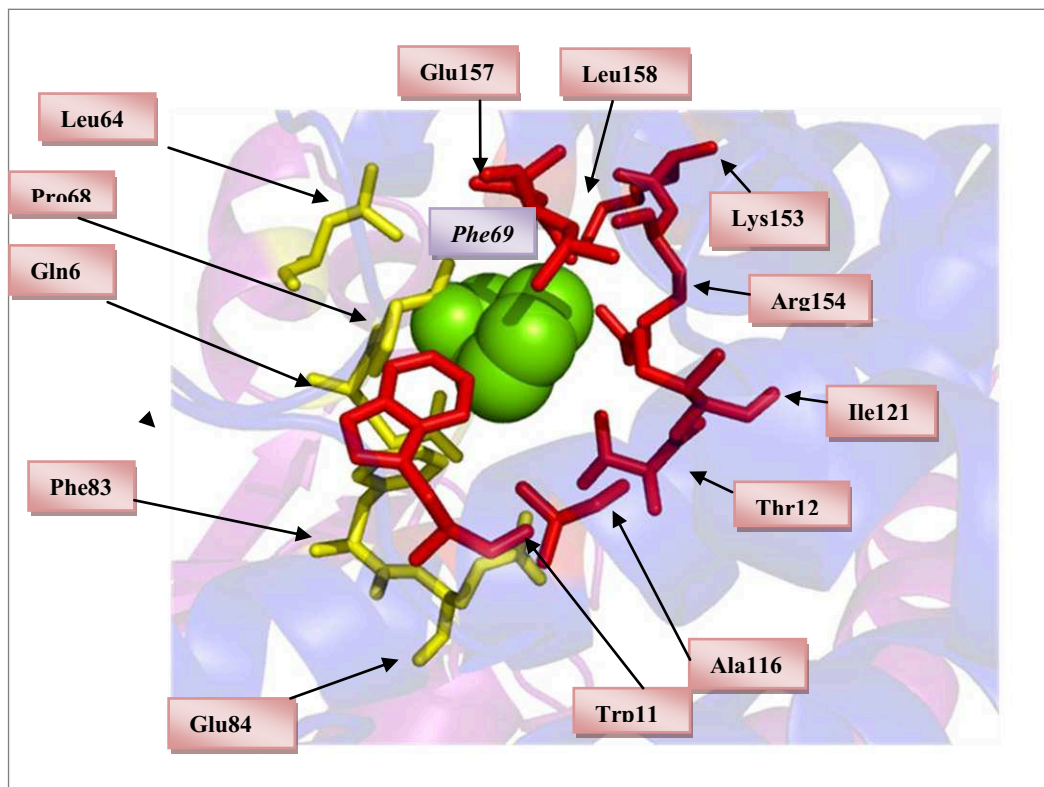
ΠΙΝΑΚΑΣ 4.7. Αλληλεπιδράσεις στην κοινή επιφάνεια των υπομονάδων Α και Β.

Υπομονάδα Α	Υπομονάδα Β
ARG109 (NH1)	ILE81(O)
ASN119(ND2)	GLU84(OE1)
THR120(OG1)	GLU84(OE2)
ARG154(NH1)	PHE69(O)
ARG29(NH2)	GLY27(O)
ASP216(OD1)	ARG136(NH1)
ASP79(OD2)	TRP140(N)
ASP79(OD2)	HIS141(N)
ASN15(N)	ALA207(O)
SER62(OG)	ASP164(OD1)
TYR66(OH)	ASP164(OD2)



ΣΧΗΜΑ 4.29. Παρουσίαση των αμινοξικών καταλοίπων της κοινής επιφάνειας των υπομονάδων Α και Β (κόκκινες και πράσινοι ράβδοι αντίστοιχα). Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας των δυο μονομερών είναι απαραίτητες για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και συνεπώς η ανάλυση τους είναι χρήσιμη στην κατανόηση της λειτουργίας του ένζυμου. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό που γενικά θεωρείται σημαντικό είναι το υδρόφοβο μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» το οποίο θεωρείται συντηρημένο στις α , μ και π τάξης GSTs (Sheehan et al., 2001). Το «κλειδί» είναι ένα αρωματικό αμινοξύ στη Ν-τελική δομική περιοχή του ενός μονομερούς ενώ την «κλειδαριά» αποτελούν κυρίως υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα της C-τελικής δομικής περιοχής του έτερου μονομερούς. Στο ένζυμο *AtuGST4* το αμινοξύ Phe69 αποτελεί το «κλειδί» του συγκεκριμένου μοτίβου του οποίου η αρωματική πλευρική αλυσίδα στρέφεται προς την διεπιφάνεια του διμερούς. Η κοιλότητα που «δέχεται» το αρωματικό αμινοξύ συγκροτείται από τα κατάλοιπα Glu157, Leu158, Lys153, Arg154, Ile121, Thr120, Ala116 και Trp123 τα οποία τοποθετούνται σε τμήματα των ελίκων H4 και H5 της C-τελικής δομικής περιοχής του δευτέρου μονομερούς και μερικά αμινοξέα που βρίσκονται μεταξύ της H2 έλικας και του $\beta 4$ ελάσματος της Ν-τελικής δομικής περιοχής του πρώτου μονομερούς (Σχήμα 4.30). Ο βρόγχος που συνδέει την H2 έλικα με το $\beta 3$ ελάσμα χαρακτηρίζεται από ένα αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης (Pro73) που είναι στη λιγότερο προτιμητέα *cis* διαμόρφωση και είναι υψηλά συντηρημένο σε όλες τις GSTs. Παρόλο που δεν παίζει κανένα ρολό στην κατάλυση φαίνεται να είναι σημαντικό στο να διατηρεί την πρωτεΐνη σε μια καταλυτικά ικανή (δεκτική) δομή (Allocati et al., 1999).



ΣΧΗΜΑ 4.30. Παρουσίαση του υδρόφωβου μοτίβου 'κλειδαριάς-κλειδιού' (lock and key) στο διμερές *AtuGST4*. Αναπαρίστανται τα αμινοξικά κατάλοιπα που συγκροτούν την 'κλειδαριά' (με κόκκινο

παρουσιάζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που ανήκουν στη Β υπομονάδα, ενώ με κίτρινο τα αμινοξικά κατάλοιπα της Α υπομονάδας), στην οποία εισχωρεί το αμινοξικό κατάλοιπο Phe69 (πράσινες σφαίρες) που αποτελεί το υδρόφοβο ‘κλειδί’ της Α υπομονάδας. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

4.3.9.2.5. Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ GSH (G-ΘΕΣΗ).

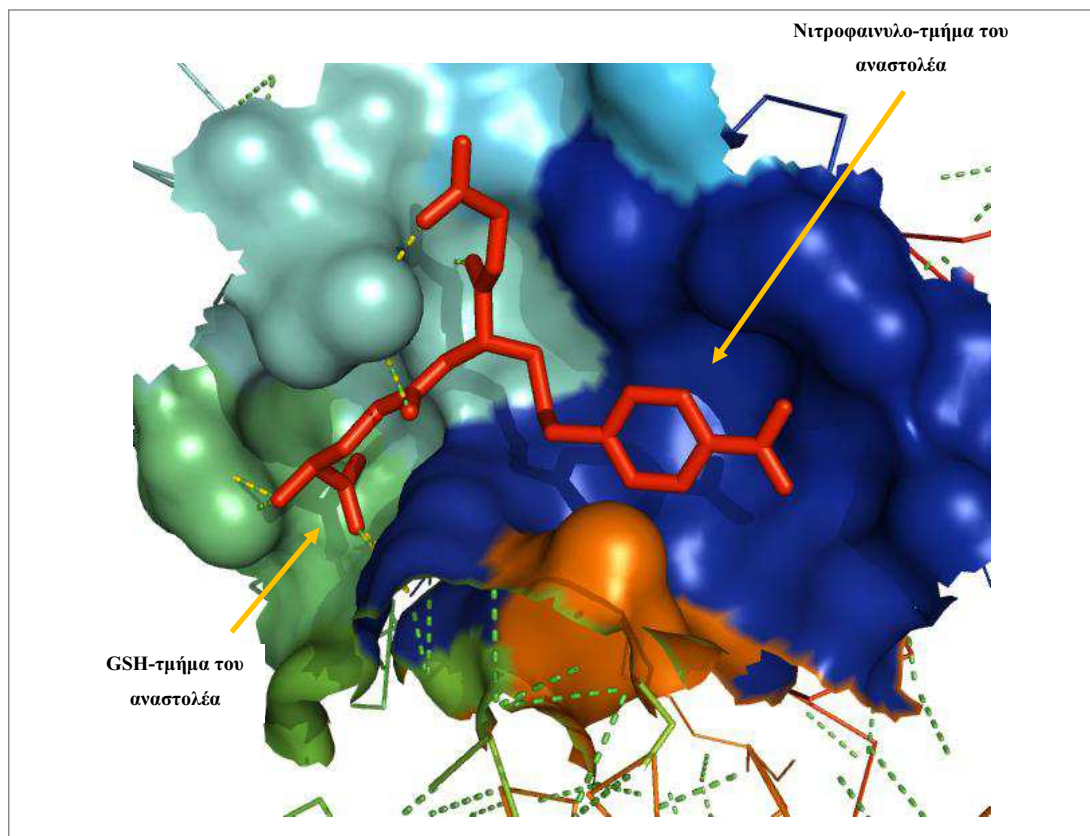
Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης *AtuGST4* φανερώνει τη πρόσδεση ενός μορίου S-p-νιτροφαινυλ-GSH σε κάθε μονομερές του ένζυμου (Σχήμα 4.27). Το S-p-νιτροφαινυλ-GSH αποτελεί για την ομάδα ενζύμων των GSTs ανάλογο υποστρώματος-προϊόντος και συναγωνιστικό αναστολέα. Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στην πρόσδεση του S-p-νιτροφαινυλο-GSH στην υπομονάδα Α του ενζύμου σε απόσταση 3,5 Å.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.8. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υπομονάδας Α της *AtuGST4* και του S-p-νιτροφαινυλ-GSH. Αναφέρονται οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των ατόμων της πρωτεΐνης και του αναστολέα και οι μεταξύ τους αποστάσεις σε Å με μέγιστο επιτρεπτό όριο τα 3,5 Å. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα iMolTalk (<http://i.mol.talk.org/>).

Αμινοξικό κατάλοιπο (άτομο)	Απόσταση (Å)	p-GSH (άτομο)	Είδος αλληλεπίδρασης
PRO25(O)	2,93	GTB3194(O41)	O[] ... O[]
ASP26(N)	3,28	GTB3194(O41)	N[] ... O[]
ASP26(CA)	3,24	GTB3194(O41)	C[] ... O[]
ASP26(CB)	3,39	GTB3194(O42)	C[] ... O[]
ASP26(CB)	3,49	GTB3194(N41)	C[] ... N[]
ASP26(CB)	3,43	GTB3194(O41)	C[] ... O[]
LEU31(O)	3,38	GTB3194(C5')	O[] ... C[]
LEU31(O)	3,48	GTB3194(C6')	O[] ... C[]
ARG33(N)	3,48	GTB3194(SG2)	N[] ... S[]
ARG33(CD)	3,35	GTB3194(O11)	C[] ... O[]
MET58(CE)	3,49	GTB3194(O2)	C[] ... O[]
GLN71(CA)	3,25	GTB3194(O2)	C[] ... O[]
GLN71(CB)	3,24	GTB3194(O2)	C[] ... O[]
GLN71(CD)	3,47	GTB3194(CD1)	C[] ... C[]
GLN71(OE1)	3,39	GTB3194(CD1)	O[] ... C[]
GLN71(OE1)	3,45	GTB3194(OE1)	O[] ... O[]
GLN71(OE1)	3,45	GTB3194(CG1)	O[] ... C[]
GLN71(NE2)	2,87	GTB3194(O32)	N[] ... O[]
GLN71(NE2)	3,32	GTB3194(OE1)	N[] ... O[]
ILE72(N)	2,88	GTB3194(O2)	N[] ... O[]
ILE72(O)	2,84	GTB3194(N2)	O[] ... N[]
ILE72(O)	3,43	GTB3194(CG1)	O[] ... C[]
GLU84(CA)	3,50	GTB3194(O12)	C[] ... O[]
GLU84(CD)	3,35	GTB3194(N1)	C[] ... N[]
SER85(N)	3,44	GTB3194(C1)	N[] ... C[]
SER85(N)	2,82	GTB3194(O12)	N[] ... O[]
SER85(OG)	2,76	GTB3194(O11)	O[] ... O[]

Η πλειονότητα των αλληλεπιδράσεων αναστολέα-πρωτεΐνης περιλαμβάνουν υδρογονικούς δεσμούς που σχηματίζουν τα πολικά άτομα του αναστολέα και ελάχιστες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Εντούτοις το καρβοξυλικό οξύ του γλυκυλο-τιμήματος (O31) του GSH του μορίου S-p-νιτροφαινυλ-GSH δεν σχηματίζει κανένα δεσμό υδρογόνου.

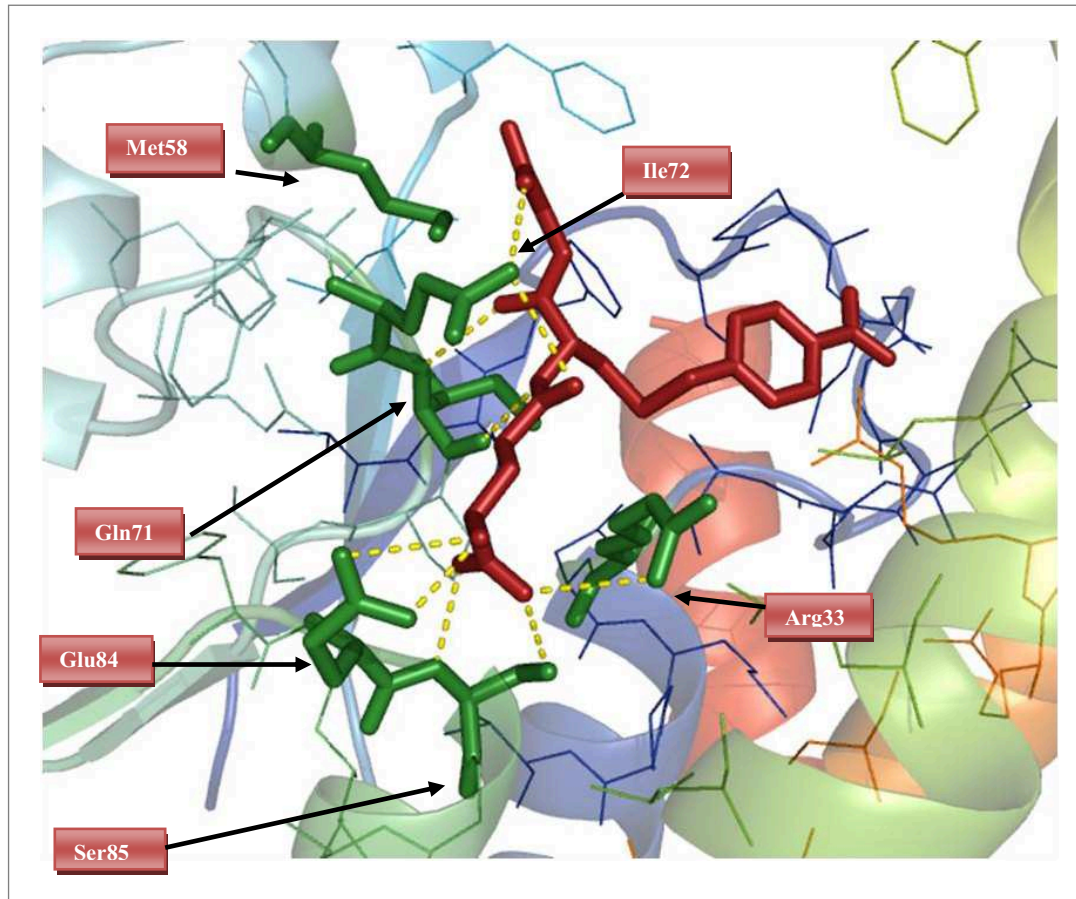
Το τμήμα του GSH του μορίου S-p-νιτροφαινυλ-GSH σταθεροποιείται σε ένα πολικό περιβάλλον το οποίο δομείται από την αρχή των ελίκων H1 και H2, της β-στροφής μετά την H3 έλικα και την αρχή της H4 έλικας στη N-τελική δομική περιοχή. Τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με την GSH ενότητα του S-p-νιτροφαινυλ-GSH είναι τα Arg33, Met58, Gln71, Ile72, Glu84 και Ser85. Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου *AtuGST4* αποκαλύπτει ότι το γ-γλουταμυλο-τιμήμα του μορίου του GSH του αναστολέα είναι προσανατολισμένο προς το κέντρο του διμερούς ενώ το γλυκυλο-τιμήμα του στρέφεται προς τα πάνω και βρίσκεται εκτεθειμένο στην περιοχή του διαλυτή (Σχήμα 4.31).



ΣΧΗΜΑ 4.31. Πρόσωση του ενεργού κέντρου της υπομονάδας A του *AtuGST4*. Το μόριο του αναστολέα του S-p-νιτροφαινυλ-GSH που είναι προσδεμένο στο ενεργό κέντρο αναπαρίσταται με κόκκινες ράβδους σύμφωνα με το συντακτικό του τύπο. Σημειώνονται το GSH- και το νιτροφαινυλο- τμήμα του μορίου του αναστολέα. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Αναλύοντας τις αλληλεπιδράσεις του γ-γλουταμυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα με τα αμινοξικά κατάλοιπα που συγκροτούν την G-περιοχή του ενεργού κέντρου (Σχήμα 4.32), παρατηρείται ότι η κετονομάδα του γ-γλουταμυλο-τμήματος δημιουργεί υδρογονικούς δεσμούς με την αμινομάδα και την κετονομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Gln71. Το αμινοξικό κατάλοιπο Ile72 σχηματίζει δυο δεσμούς υδρογόνου, έναν με το N της αμινομάδας και έναν με τον C που ακολουθεί την ομάδα C=O του γ-γλουταμυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα. Και οι δυο δεσμοί αλληλεπιδρούν με το OH του καρβοξυλίου της κύριας αλυσίδας του αμινοξέος. Επίσης το N της αμινομάδας του γ-γλουταμυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα σχηματίζει γέφυρες άλατος με την αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξικού καταλοίπου Glu84. Ο συγκεκριμένος δεσμός σε συνδυασμό με τις ισχυρές πολικές αλληλεπιδράσεις του γλυκυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα με το άζωτο και την καρβοξυλομάδα του πεπτιδικού δεσμού της Ser85 φαίνεται να αποτελούν παράγοντες σταθεροποίησης του προσδεμένου μορίου στη G-θέση του ενεργού κέντρου.

Όσον αφορά το γλυκυλο-τμήμα του GSH του αναστολέα αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξικά κατάλοιπα Met58, Gln71 και Ile 72. Και τα τρία αμινοξέα αλληλεπιδρούν με την κετονομάδα του γλυκυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα. Ειδικότερα η Met58 αντιδρά με τον ακραίο άνθρακα της πλευρικής της ομάδας και η Ile 72 με το άζωτο του πεπτιδικού της δεσμού σχηματίζοντας υδρογονικούς δεσμούς. Η Gln71 δημιουργεί έναν ακόμη δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της με την κετονομάδα του γλυκυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα. Τέλος, η σουλφυδρυλική ομάδα του κυστεΐνυλο-τμήματος του GSH του αναστολέα αναπτύσσει δεσμό Van der Waals με την Arg33.



ΣΧΗΜΑ 4.32. Παρουσιάζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα (πράσινοι ράβδοι) που συγκροτούν την G θέση του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης *AtuGST4*. Το μόριο του αναστολέα του S-p-νιτροφαινυλ-GSH αναπαρίσταται με κόκκινες ράβδους. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

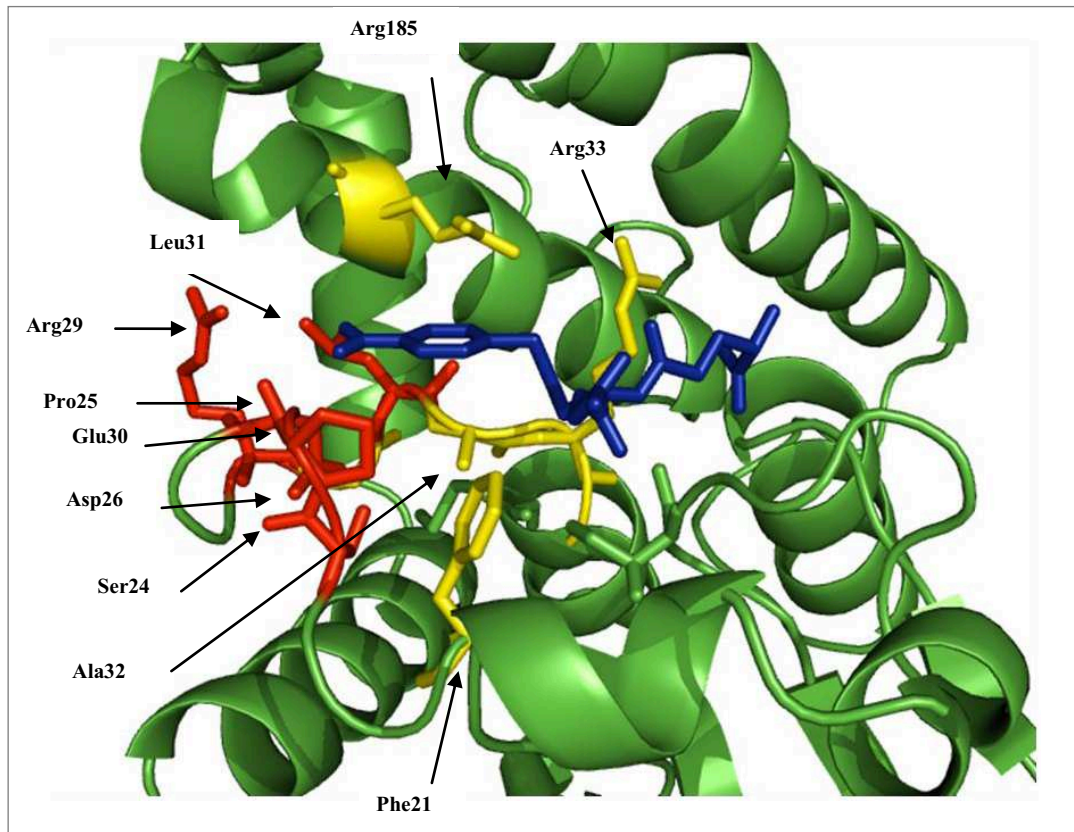
4.3.9.2.6. Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (H-ΘΕΣΗ).

Ο ρόλος της H-θέσης γενικά είναι να δεσμεύει ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα και να τα προσανατολίζει με τέτοιο τρόπο ώστε να δέχονται νουκλεόφιλη προσβολή από τη -SH ομάδα της γλουταθειόνης (thiolate). Εντούτοις, σε μερικές περιπτώσεις, η πρόσδεση στην H-θέση ενεργοποιεί το ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα μέσω εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων που οδηγούν άμεσα στην κατάλυση. Οι H-θέσεις των GSTs εμπλέκονται στη δέσμευση διαφορετικών υποστρωμάτων και για αυτό διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες τάξεις των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και σε μικρότερο βαθμό ανάμεσα στα ένζυμα της ίδιας τάξης. Οι θ τάξεως GSTs χαρακτηρίζονται από μια συγκεκριμένη, περισσότερο άκαμπτη δομή των H-θέσεων, ενώ οι H-θέσεις των μ , π , α είναι πιο εύκαμπτες ώστε να βελτιστοποιούν

την πρόσδεση του υποστρώματος και την καταλυτική τους ικανότητα (Board et al., 1995, Lim et al., 1994). Στις μ και α τάξεις GSTs οι Η-θέσεις είναι γενικά υδρόφοβες ενώ οι πρωτεΐνες της π τάξης χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων επιφανειών διευκολύνοντας την αναγνώριση υποστρωμάτων που έχουν πολικές και μη πολικές ενότητες (Hiratsuka et al., 1994).

Την Η-θέση του ενζύμου *AtuGST4* σχηματίζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα Leu31, Gly30, Asp26, Ser24, Pro25, Arg29, Ala32 και Phe21 τα οποία βρίσκονται στο κάτω επίπεδο του 4-νιτροφαινυλο-τμήματος του αναστολέα και το αμινοξύ Arg185 που τοποθετείται στο πάνω επίπεδο (Σχήμα 4.33). Το αμινοξύ Arg29 βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της Η-θέσης η οποία προσανατολίζεται προς τον διαλυτή, ενώ το αμινοξικό κατάλοιπο Arg33 τοποθετείται στην αντίθετη πλευρά, και τα δυο σε κατακόρυφο επίπεδο. Ο αναστολέας βρίσκεται σε απόσταση μικρότερη ή ίση με 4Å από όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα που προαναφερθήκαν και τα οποία δομούν μια κοιλότητα με ως επί το πλείστον υδρόφοβο χαρακτήρα.

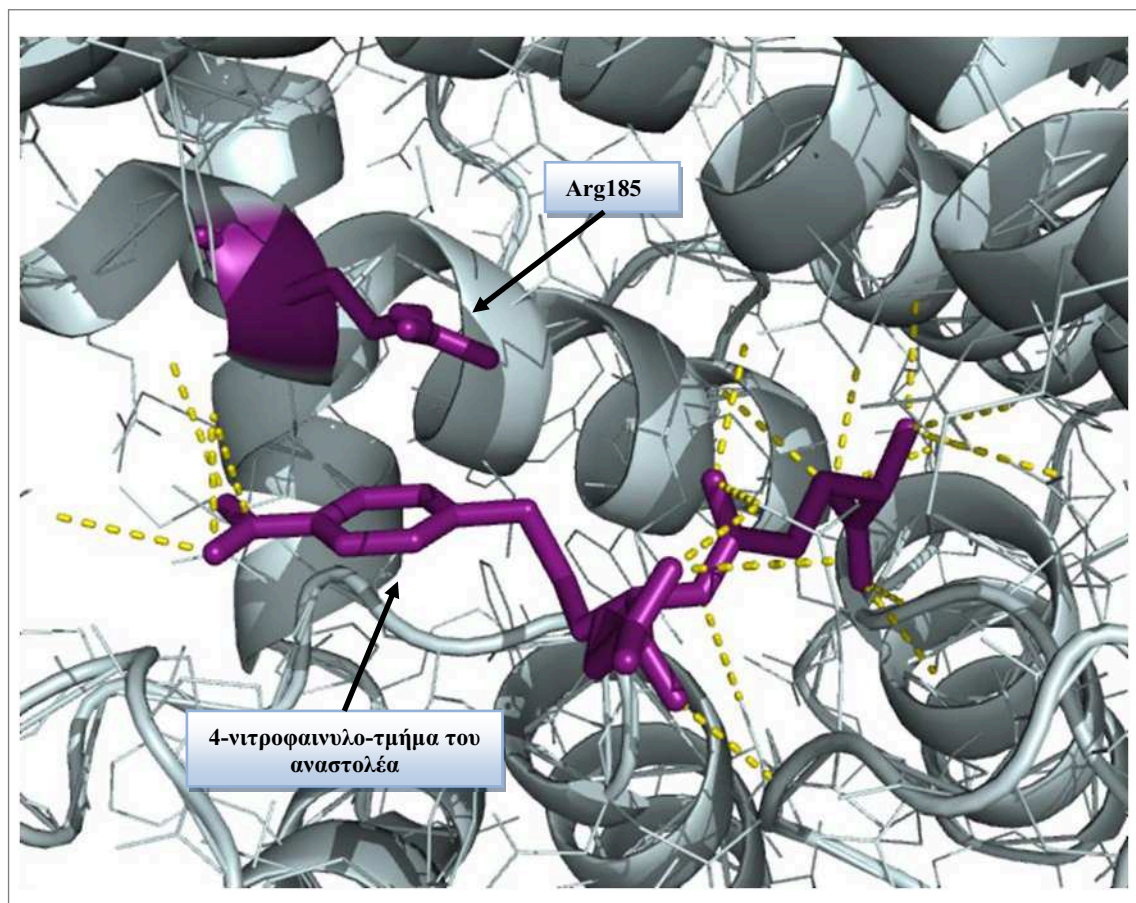
Το ογκώδες αμινοξύ Arg29 καλύπτει με την πλευρική αλυσίδα του την είσοδο της Η περιοχής που βρίσκεται στην εκτεθειμένη προς το διαλυτή περιοχή. Το 4-νιτροφαινυλο-τμήμα του αναστολέα συνδέεται με ένα μόνο δεσμό υδρογόνου με τη θετικά φορτισμένη αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της αργινίνης. Εκατέρωθεν της Arg29 βρίσκονται τέσσερα μικρότερα αμινοξέα, η Leu31 από την μια πλευρά και τα Ser24, Pro25 και Asp26 από την άλλη σχηματίζοντας μαζί με το αμινοξικό κατάλοιπο της αργινίνης ένα προστατευτικό τείχος γύρω από την είσοδο της Η-θέσης του ενεργού κέντρου (Σχήμα 4.33). Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα η ύπαρξη του φυσικού αυτού εμποδίου στην αρχή της Η-θέσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Συνακόλουθα, τα τέσσερα αμινοξέα είναι δυνατό να επηρεάζουν έμμεσα τη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής της Η-θέσης.



ΣΧΗΜΑ 4.33. Παρουσίαση των αμινοξικών καταλοίπων που συγκροτούν την Η-θέση δέσμησης στο ενεργό κέντρο της υπομονάδας Α (αναπαράσταση cartoon με πράσινο χρώμα). Τα αμινοξικά κατάλοιπα Arg29, Ser24, Pro25 και Asp26 που αποτελούν ένα φυσικό ‘εμπόδιο’ προς την είσοδο της Η-θέσης αναπαρίστανται με κόκκινο χρώμα. Το μόριο του αναστολέα του S-p-νιτροφαινυλ-GSH αναπαρίσταται με μπλε ράβδους σύμφωνα με το συντακτικό του τύπο. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

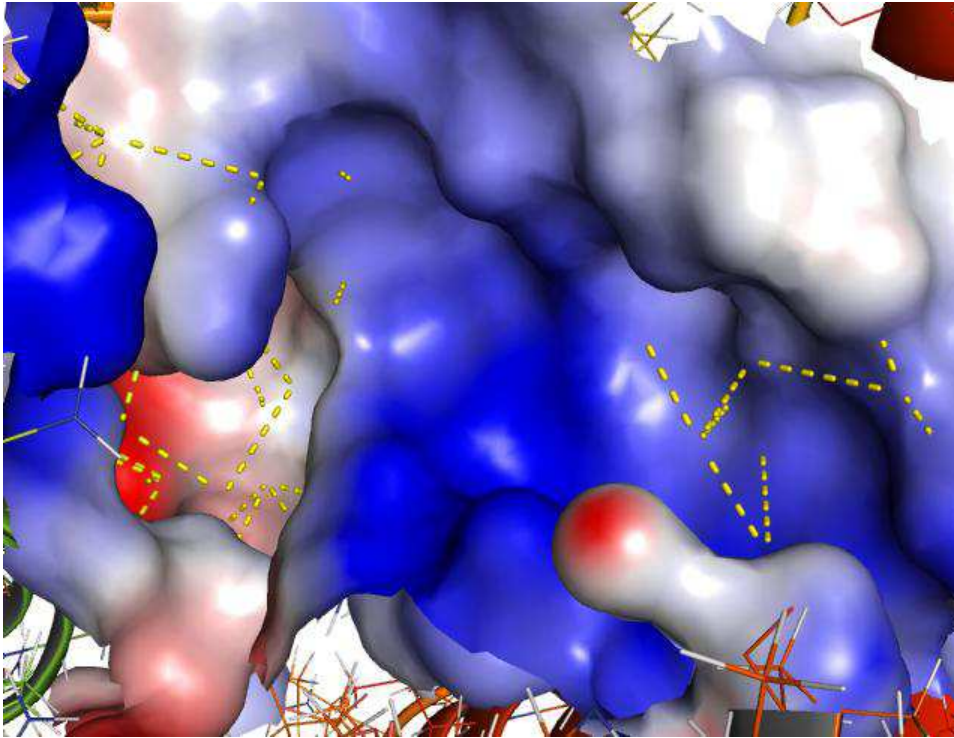
Η Arg185 τοποθετείται σε επίπεδο παράλληλο ως προς το μόριο του αναστολέα και η πλευρική ομάδα του αμινοξέος βρίσκεται σχεδόν απέναντι από τη φαινυλ-ομάδα του 4-νιτροφαινυλο-τμήματος του αναστολέα όπου εντοπίζεται π-ηλεκτρονιακό νέφος. Αξίζει να τονιστεί ότι η πλευρική ομάδα του αμινοξέος δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με όλους τους άνθρακες του φαινολικού δακτυλίου του 4-νιτροφαινυλο-τμήματος του αναστολέα (Σχήμα 4.34) και προφανώς το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο συμμετέχει στον καταλυτικό μηχανισμό. Η ισχυρή αλληλεπίδραση του με τον φαινολικό δακτύλιο του αναστολέα ενδεχομένως σταθεροποιεί τη δέσμευση αρωματικών υποστρωμάτων στην καταλυτικά ‘σωστή’ τους διαμόρφωση.

Η πλευρική αλυσίδα Phe21 αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με την κετονομάδα και την ημινομάδα της μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας πλησιέστερα στο 4-νιτροφαινυλο-τμήμα του αναστολέα. Επίσης αλληλεπιδρά και με τη S-ομάδα και τους άνθρακες C2 και C3 του φαινολικού δακτυλίου του αναστολέα. Οι χημικές αυτές αλληλεπιδράσεις ενδεχομένως να επηρεάζουν τη θέση και τον προσανατολισμό του καταλυόμενου μορίου.



ΣΧΗΜΑ 4.34. Παρουσίαση της θέσης του αμινοξικού καταλοίπου Arg185 της Η-θέσης του ενεργού κέντρου σε σχέση με το νιτροφαινυλο-τμήμα του αναστολέα. Το Arg185 σχηματίζει πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με το εντοπισμένο π-ηλεκτρονικό νέφος του νιτροφαινυλο-τμήματος του αναστολέα. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

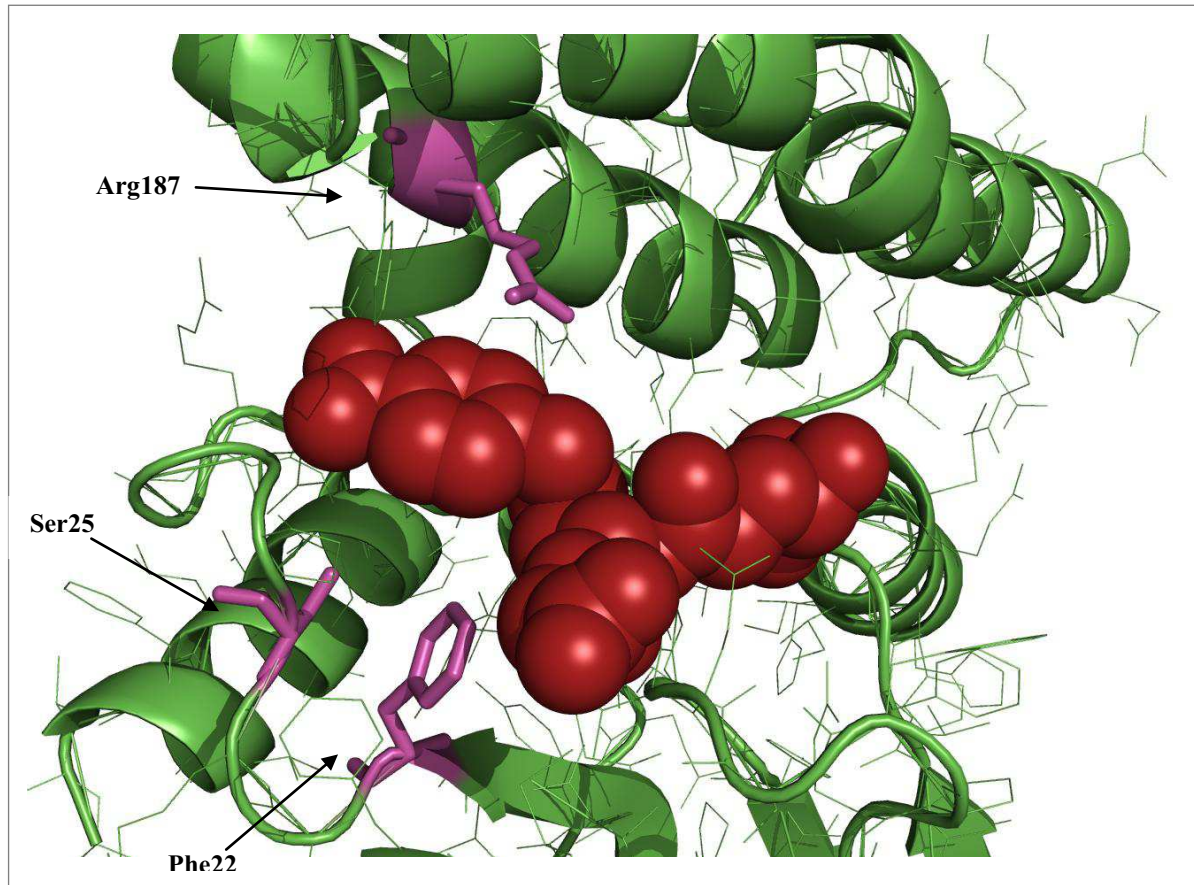
Το θετικό φορτίο της Η-θέσης δέσμησης των ξενοβιοτικών ενώσεων (Σχήμα 4.36) οφείλεται κυρίως την ύπαρξη θετικών αμινοξικών καταλοίπων αργινίνης (Arg29, Arg33, Arg184, Arg185) τα οποία περιβάλλουν τη συγκεκριμένη περιοχή. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της Η-θέσης, επομένως, επιτρέπει τη δέσμηση αρνητικά φορτισμένων υποστρωμάτων.



ΣΧΗΜΑ 4.35. Η ηλεκτροστατική επιφάνεια της Η-θέσης του ενεργού κέντρου του ενζύμου *AtuGST4*. Τα αρνητικά, θετικά και ουδέτερα ηλεκτρονιακά φορτία παρουσιάζονται σαν σκιές κόκκινου, μπλε και άσπρου χρώματος, αντίστοιχα. Φαίνεται καθαρά ότι η Η-θέση του ενεργού κέντρου αποτελεί μια θετικά φορτισμένη περιοχή. Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

4.3.10. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

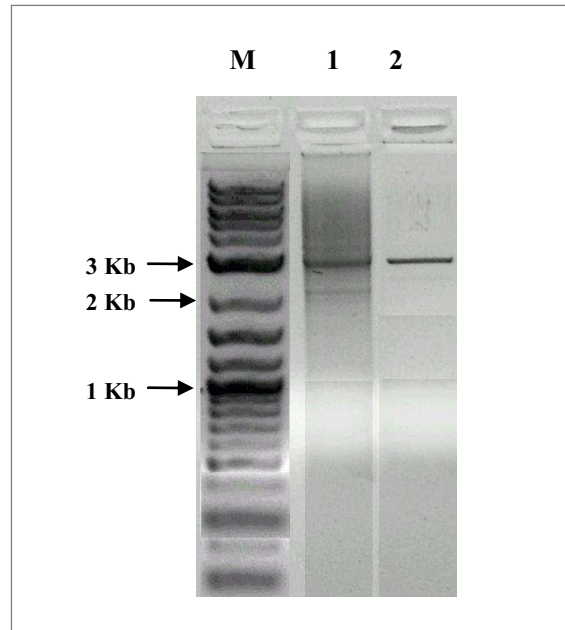
Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης *AtuGST4* υπέδειξε τρία αμινοξικά κατάλοιπα (Σχήμα 4.36) τα οποία αποτέλεσαν στόχο κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην καταλυτική διαδικασία. Τα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις Phe22, Ser25 και Arg187 μετατράπηκαν σε αλανίνη χρησιμοποιώντας τις μεθόδους PCR, quick change (για τις μεταλλάξεις Phe22Ala και Ser25Ala) και επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (για τη μετάλλαξη Arg187Ala).



ΣΧΗΜΑ 4.36. Η θέση των αμινοξέων Phe22, Ser25 και Arg187 κοντά στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης *AtuGST4* τα οποία και αποτέλεσαν στόχο κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.

4.3.10.1. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4* ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ Phe22 ΚΑΙ Ser25.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερής και η τεχνική quick change (Παράγραφος 4.2.10) χρησιμοποιήθηκαν για να προκληθούν σημειακές μεταλλάξεις στο ένζυμο *AtuGST4*. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση δυο αμινοξέων, με μια αντίδραση PCR για κάθε υποκατάσταση, με τη βοήθεια της Pfu πολυμερής η οποία αναπαράγει και τις δυο αλυσίδες του πλασμιδίου με υψηλή πιστότητα και χωρίς να εκτοπίζει τους εκκινητές που περιέχουν την μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις αφορούν τα αμινοξέα στις θέσεις Phe22 και Ser25 τα οποία μετατραπήκαν σε Ala. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR είναι ~3,3 kb (μέγεθος φορέα pEXP5-CT/TOPO 2,6 kb και μέγεθος γονιδίου *AtuGST4* 0,69 kb) το οποίο επιβεβαιώνεται μετά από ανάλυση των προϊόντων σε πηκτική αгарόζης (Σχήμα 4.37).



ΣΧΗΜΑ 4.37. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν κατά την κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του *AtuGST4* στις θέσεις Phe22 και Ser25. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-log DNA marker (M). Θέση 1: το προϊόν της PCR αντίδρασης με εκκινητές fGSTF9 και rGSTF9, δηλαδή το μεταλλαγμένο γονίδιο Phe22Ala μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO. Θέση 2: το προϊόν της PCR αντίδρασης με εκκινητές fGSTS9 και rGSTS9, δηλαδή το μεταλλαγμένο γονίδιο Ser25Ala μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO. Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε Kb.

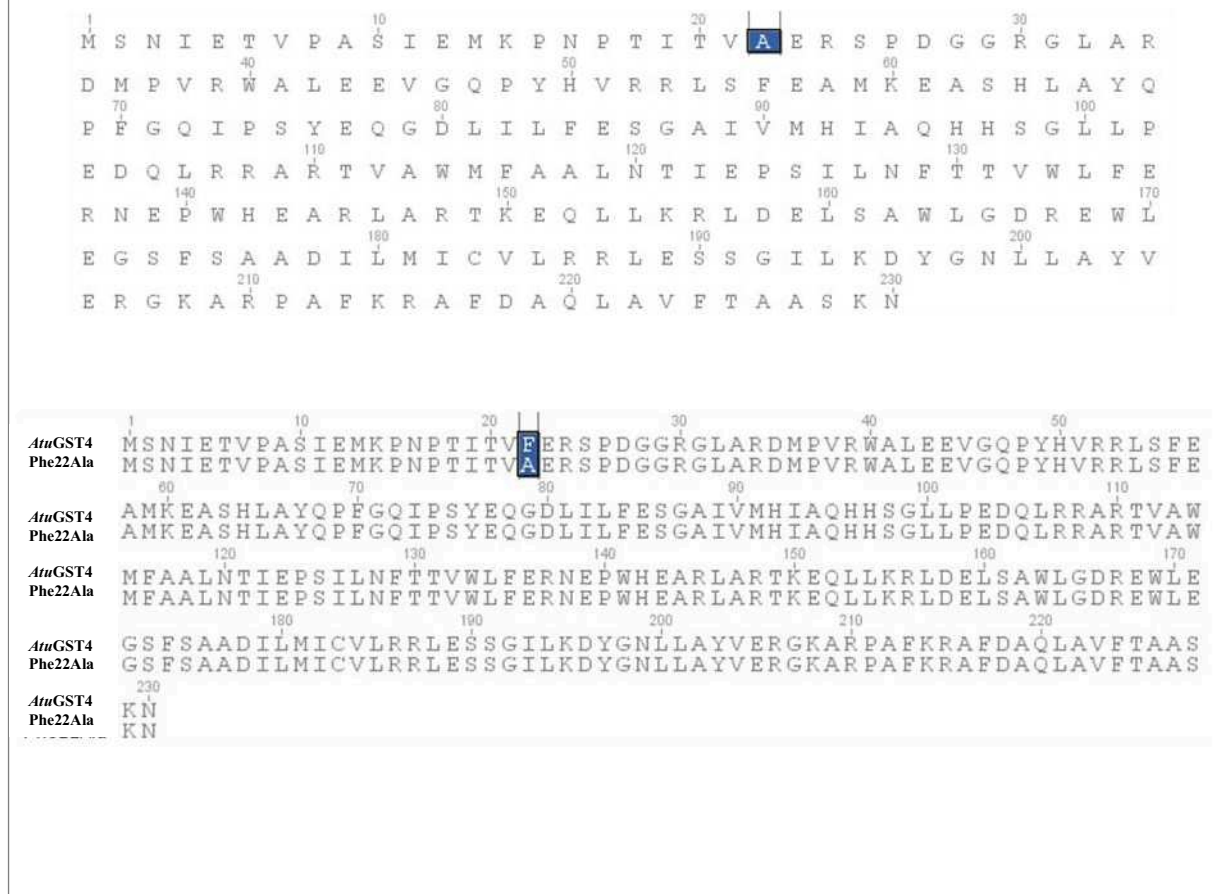
Τα νεοσυντεθέντα πλασμίδια, διαχωρίστηκαν στη συνέχεια, από το μητρικό πλασμίδιο με πέψη των προϊόντων PCR με το περιοριστικό ένζυμο DpnI (παράγραφος 2.4.5). Η ενδονουκλεάση DpnI κατατέμνει το DNA στην παλίνδρομη αλληλουχία GATC μόνο όταν η αδερίνη και στις δύο αλυσίδες είναι μεθυλιωμένη (N⁶-μεθυλ-αδερίνη, m6A). Εκτεταμένη μεθυλίωση των βάσεων αδερίνης συμβαίνει κατά τη σύνθεση του DNA στα προκαρυωτικά κύτταρα. Η ανθεκτικότητα στην κατάτμηση από DpnI επιτρέπει τη διάκριση DNA που έχει συντεθεί *in vitro* από DNA που προέρχεται από βακτηριακά κύτταρα.

Τα μεταλλαγμένα πλασμίδια απομονώθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου που περιγράφεται στην παραγραφο 2.4.3 και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21DE3 (παράγραφος 2.4.2). Η επιλογή των μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια βακτηρίων έγινε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχαν αντιβιοτικό αμικιλίνη. Ανθεκτικές στην αμικιλίνη αποικίες επιλέχτηκαν τυχαία και ακολούθησε ανάπτυξη τους σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού. Προκειμένου να

ελεγχθεί έμμεσα η ύπαρξη των σημειακών μεταλλάξεων ακολούθησε έκφραση των γονιδίων με τη γνωστή διαδικασία που περιγράφεται στην παραγραφο 2.4.13. Η παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος έγινε με λύση των βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση υπερήχων ενώ ακολούθησε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηκότητας των μεταλλαγμένων κλώνων ως προς τα υποστρώματα CDNB (παράγραφος 2.4.19.1) και CuOOH (παράγραφος 2.4.19.2) και ποσοτικός υπολογισμός της πρωτεΐνης τους με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 2.4.10).

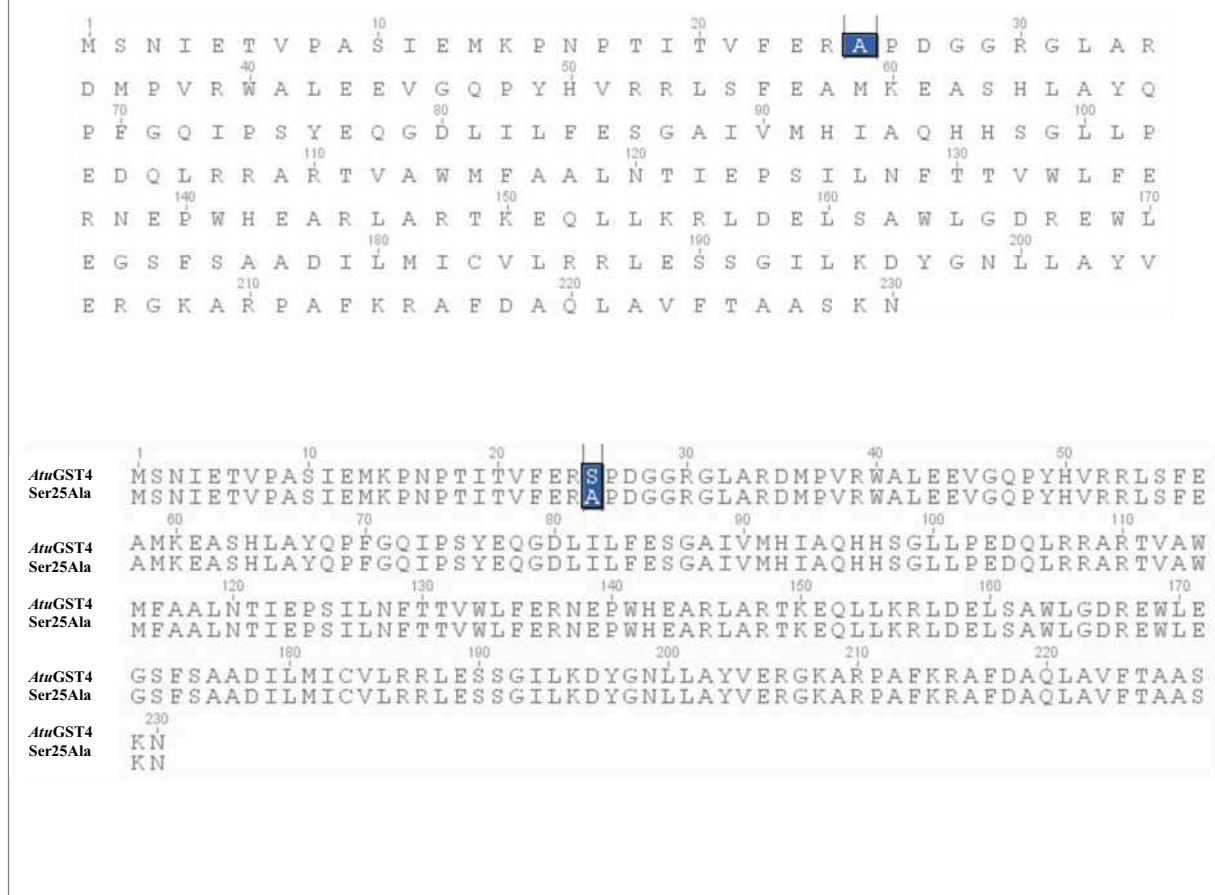
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων κατέδειξε διαφορετικά αποτελέσματα για τους μεταλλαγμένους κλώνους που περιείχαν την μετάλλαξη Phe22→Ala22 και για τους κλώνους με την μετάλλαξη Ser25→Ala25. Οι κλώνοι που εξετάστηκαν παρουσίασαν διαφορετική ειδική δραστηκότητα ως προς τα υποστρώματα CDNB και CuOOH.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει απομόνωση πλασμιδιακού DNA από δυο επιλεγμένους κλώνους (έναν για κάθε μετάλλαξη) με τη συστηματοποιημένη μέθοδο QIAquick™ Mini Prep Kit (Qiagen). Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων Πραγματοποιήθηκε με αλληλούχιση των πρωτεϊνών (MWG-Biotech AG, Γερμανία) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές (T7-forward). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επεξεργαστήκαν με τα προγράμματα Translate (<http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>) με το οποίο πραγματοποιήθηκε η μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και το πρόγραμμα Geneious 4.7.4 με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών του άγριου τύπου με τις μεταλλαγμένες μορφές (Σχήμα 4.38 για τη μεταλλαγμένη μορφή Phe22Ala και Σχήμα 4.39 για τη μεταλλαγμένη μορφή Ser25Ala).

Αμινοξική αλληλουχία μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuPhe22*

ΣΧΗΜΑ 4.38. Ευθυγραμμισή των αμινοξικών αλληλουχιών του ένζυμου *AtuGST4* και του μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuPhe22*. Με μπλε χρώμα επισημαίνεται η θέση της μετάλλαξης *Phe22Ala*. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται η αμινοξική ακολουθία του άγριου τύπου *AtuGST4* και επισημαίνεται η θέση του αμινοξικού καταλοίπου *Phe22* το οποίο υπέστη κατευθυνόμενη μεταλλαξίγνεση με τη μέθοδο Quick Change PCR.

Αμινοξική αλληλουχία μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuSer25*

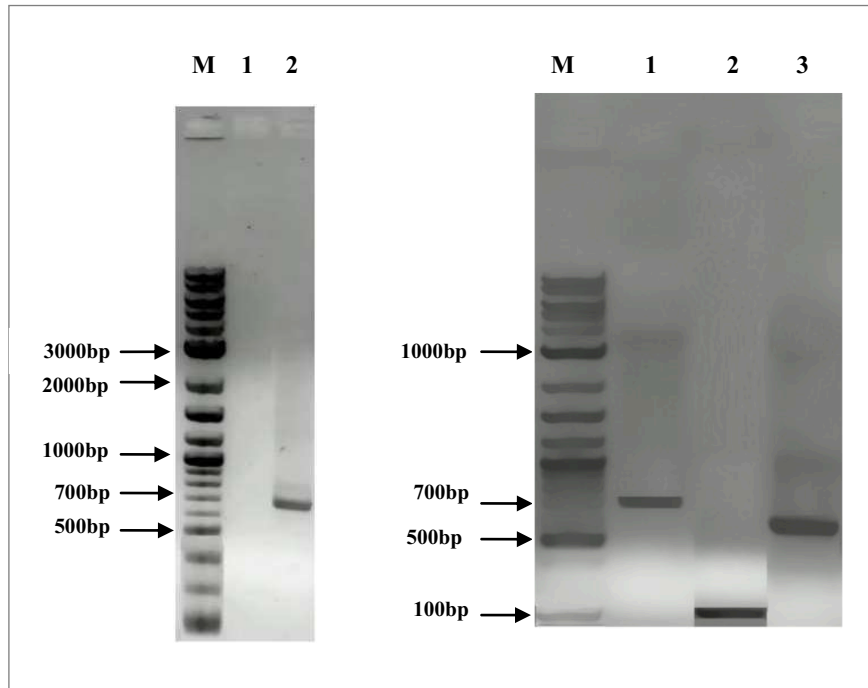


ΣΧΗΜΑ 4.39. Ευθυγραμμισή των αμινοξικών αλληλουχιών του ένζυμου *AtuGST4* και του μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuSer22*. Με μπλε χρώμα επισημαίνεται η θέση της μετάλλαξης *Ser22Ala*. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται η αμινοξική ακολουθία του άγριου τύπου *AtuGST4* και επισημαίνεται η θέση του αμινοξικού καταλοίπου *Ser22* το οποίο υπέστη κατευθυνόμενη μεταλλαξίγένηση με τη μέθοδο Quick Change PCR.

4.3.10.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4* ΣΤΗ ΘΕΣΗ *Arg187Ala*.

Η σημειακή μετάλλαξη του ένζυμου *AtuGST4* με σκοπό την αντικατάσταση της *Arg187* από την *Ala* πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια με την τεχνική της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap extension). Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.2.11. Τα δυο τμήματα του γονιδίου που παράγονται κατά το πρώτο στάδιο PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε

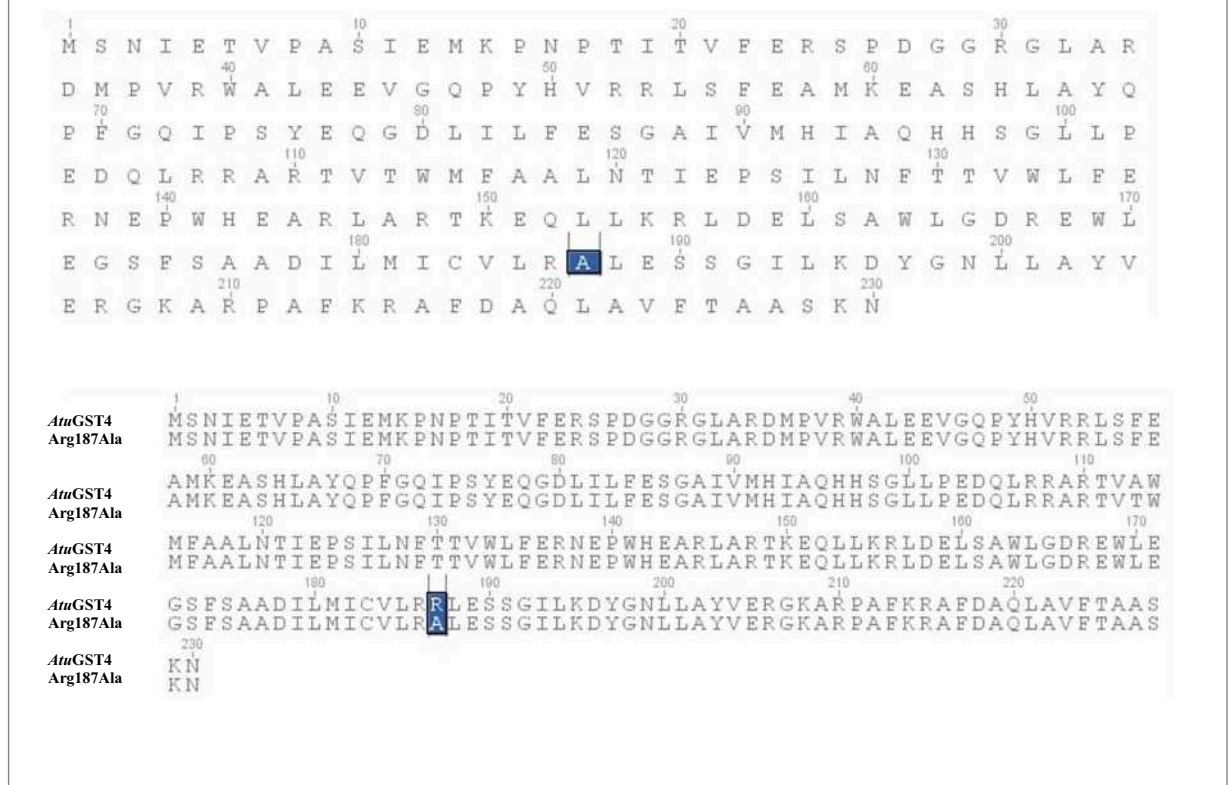
πηκτή αγαρόζης (Σχήμα 4.40). Τα τμήματα αδ και γβ έχουν μεγέθη 561 bp και 129 bp αντιστοιχα.



ΣΧΗΜΑ 4.40. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν κατά την κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του *AtuGST4* στη θέση Arg187. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 2-log DNA marker (M). Α. Θέση 1: το προϊόν της PCR αντίδρασης χωρίς εκκινητές (μάρτυρας), θέση 2: το προϊόν της τελικής PCR αντίδρασης (εκκινητές fGSTD9 και rGSTD9), δηλαδή το πλήρους μήκους μεταλλαγμένο γονίδιο Β. Θέση 1: το προϊόν της PCR αντίδρασης με εκκινητές fGSTD9 και rGSTD9 δηλαδή το πλήρους μήκους γονίδιο, θέση 2: το προϊόν της PCR αντίδρασης με εκκινητές fGSTA9 και rGSTD9 (τμήμα γβ μεγέθους περίπου 130 bp), θέση 3: το προϊόν της PCR αντίδρασης με εκκινητές fGSTD9 και rGSTA9 (τμήμα αδ μεγέθους περίπου 600 bp). Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.

Τα τμήματα του γονιδίου που παρήχθησαν κατά το πρώτο στάδιο PCR προκειμένου να απαλλαγθούν από υπολείμματα μητρικού πλασμιδίου υπέστησαν πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI. Η δράση του περιοριστικού ένζυμου πραγματοποιήθηκε κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες που περιγράφονται στην παραγραφο 2.4.5. Το δεύτερο στάδιο PCR που ακολούθησε έδωσε το τελικό μεταλλαγμένο γονίδιο αποτελούμενο από τα προηγούμενα τμήματα που παρήχθησαν κατά το πρώτο στάδιο. Το τελικό προϊόν του δεύτερου σταδίου PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης ενώ το μέγεθος του πλήρους γονιδίου Όπως φαίνεται

στο Σχήμα 4.45 ήταν το αναμενόμενο (690bp). Ως μάρτυρας πραγματοποιήθηκε όμοια PCR αντίδραση χωρίς την προσθήκη εκκινητών. Το προϊόν της τελικής PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] και κύτταρα *E. coli* TOP10 μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο DNA μέσω της τεχνολογίας του TOPO Cloning όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.9. Ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ που φέρουν αμπικιλίνη (0,1 mg/ml) και καλλιέργειά τους για 16 h. Επιλέχθηκαν, στη συνέχεια, αποικίες με βάση την ανθεκτικότητά τους στην αμπικιλίνη και απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) προκειμένου να ακολουθήσει έκφραση των μεταλλαγμένων κλώνων που επιλεχθήκαν. Μετά την ολοκλήρωση της έκφρασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε η λύση τους με επίδραση υπερήχων. Η ενζυμική δραστηριότητα των μεταλλαγμένων μορφών ελέγχθηκε με φωτομετρικές μεθόδους χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το CDNB (παράγραφος 2.4.19.1) και το CuOOH (παράγραφος 2.4.19.2), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 2.4.10). Η ειδική δραστηριότητα (S.A.) των μεταλλαγμένων μορφών κυμάνθηκαν κοντά στην τιμή 0,09 U/mg για το υπόστρωμα CDNB και 0,25 U/mg για το CuOOH. Με την κατάλληλη συστηματοποιημένη μέθοδο του QIAquick[™] Mini Prep Kit απομονώθηκε DNA από μια μεταλλαγμένη μορφή που επιλεχθηκε με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα και ελέγχθηκε ως προς την αλληλουχία της σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech AG, Γερμανία) χρησιμοποιώντας ως ευκίνητη τον T7-term. Με τη βοήθεια των κατάλληλων λογισμικών πραγματοποιήθηκε μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (ηλεκτρονικό πρόγραμμα: Translate, <http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>), ευθυγραμμισή των αμινοξικών ακολουθιών του άγριου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής και επιβεβαίωση της σημειακής μετάλλαξης Arg187→Ala187 (ηλεκτρονικό πρόγραμμα: Geneious 4.7.4). Στο Σχήμα 4.41 παρουσιάζεται η αμινοξική ακολουθία της μεταλλαγμένης μορφής και η σύγκριση της με αυτήν του ένζυμου *AtuGST4*, στις οποίες τονίζεται με έγχρωμο πλαίσιο η μετατροπή του αμινοξέος Arg σε Ala στη θέση 187 της ακολουθίας.

Αμινοξική αλληλουχία μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuArg187*

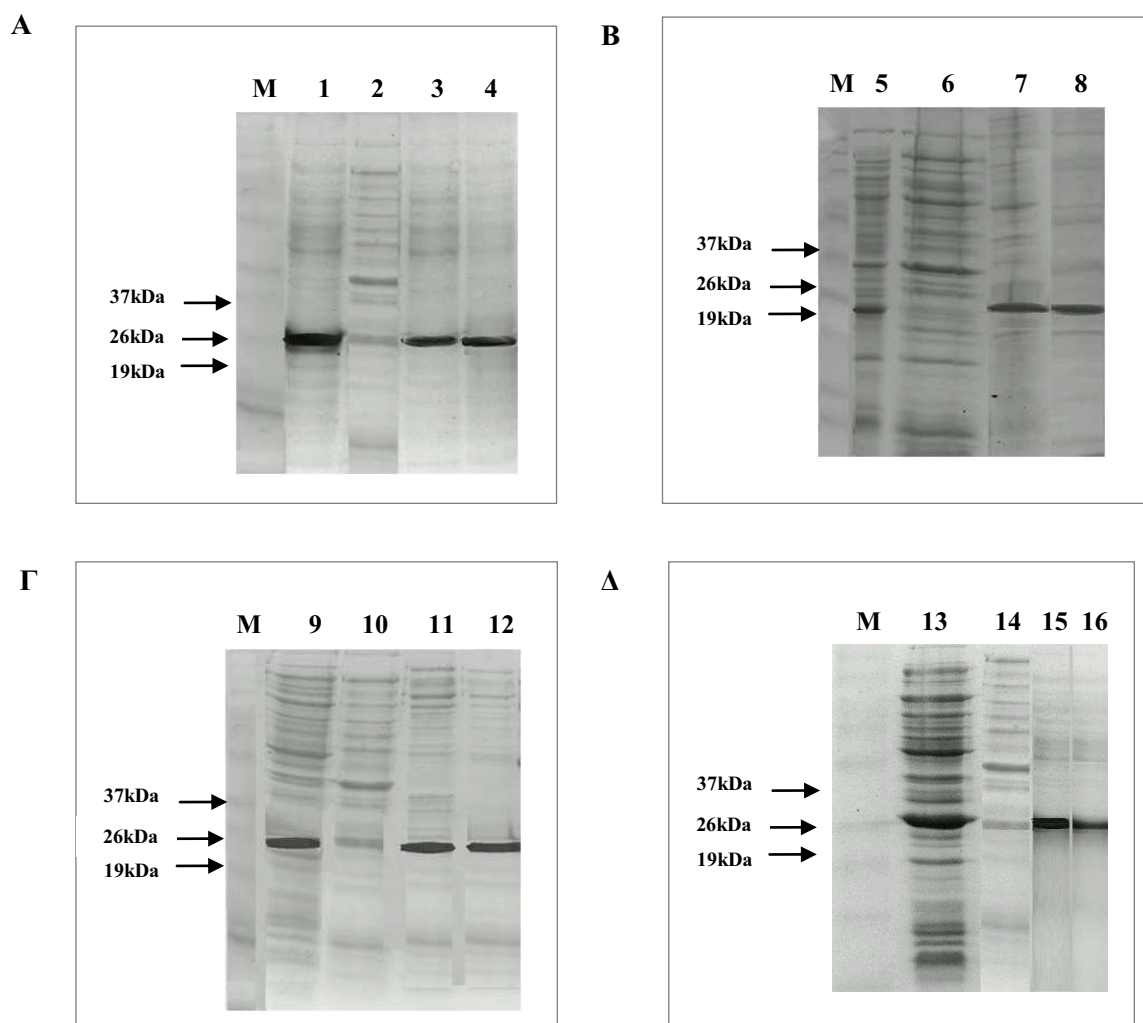
ΣΧΗΜΑ 4.41. Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών του ένζυμου *AtuGST4* και του μεταλλαγμένου ενζύμου *AtuArg187*. Με μπλε χρώμα επισημαίνεται η θέση της μετάλλαξης Arg187Ala. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται η αμινοξική ακολουθία του άγριου τύπου *AtuGST4* και επισημαίνεται η θέση του αμινοξικού καταλοίπου Arg187 το οποίο υπέστη κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο PCR επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης.

4.3.10.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Ο καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών του ένζυμου *AtuGST4* πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη με ακινητοποιημένο νικέλιο (Ni^{+2}) (παράγραφος 2.4.17). Τα αποτελέσματα του καθαρισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.9. Η καθαρότητα των ενζύμων εκτιμήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) (Σχήμα 4.43).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.9. Απόδοση καθαρισμού των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala με χρωματογραφία στήλης στον προσροφητή Ni-NTA. Η διαδικασία καθαρισμού περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.17.

Ένζυμο	Απόδοση (%)
Phe22Ala	45,37
Ser25Ala	98,12
Arg187Ala	87,63



ΣΧΗΜΑ 4.42. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώ-

ση με Coomassie Brilliant Blue R-250. Α: Καθαρισμός άγριου τύπου *AtuGST4*. Β: Καθαρισμός μεταλλαγμένης μορφής Phe22Ala, Γ: Καθαρισμός μεταλλαγμένης μορφής Ser25Ala, Δ: Καθαρισμός μεταλλαγμένης μορφής Arg187Ala. Αναλυτικά: θέση Μ: μάρτυρας μοριακής μάζας (Protein Market Broad Range). θέση 1: ακατέργαστο εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη *AtuGST4* μετά από προσθήκη IPTG κατά την έκφραση, θέσεις 5, 9, 13: ακατέργαστο εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO[®], στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για τις μεταλλαγμένες μορφές Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala μετά από προσθήκη IPTG κατά την έκφραση, θέσεις 2, 6, 10, 14: μη προσροφημένα κλάσματα, θέσεις 3, 7, 11, 15: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των εκλούσεων των καθαρών πρωτεϊνών *AtuGST4*, Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala αντίστοιχα, θέση 4: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του καθαρού ενζύμου *AtuGST4* που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni-NTA, θέση 8, 12, 16: ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των καθαρών ενζύμων Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala αντίστοιχα, που παραλήφθηκαν μετά από χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni-NTA. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε kDa.

4.3.10.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala.

Οι μεταλλαγμένες μορφές Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala εξεταστήκαν ως προς την κινητική τους συμπεριφορά για τα υποστρώματα GSH, CDNB και CuOOH. Οι κινητικές σταθερές των μεταλλαγμένων ενζύμων καθώς και του άγριου τύπου παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.10 για τα ζεύγη υποστρωμάτων GSH/CDNB και GSH/CuOOH, ενώ η εξάρτηση της ενζυμικής ταχύτητας σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων παριστάνεται γραφικά στο σχήμα 4.43 για το GSH/CDNB και στο σχήμα 4.44 για το GSH/CuOOH.

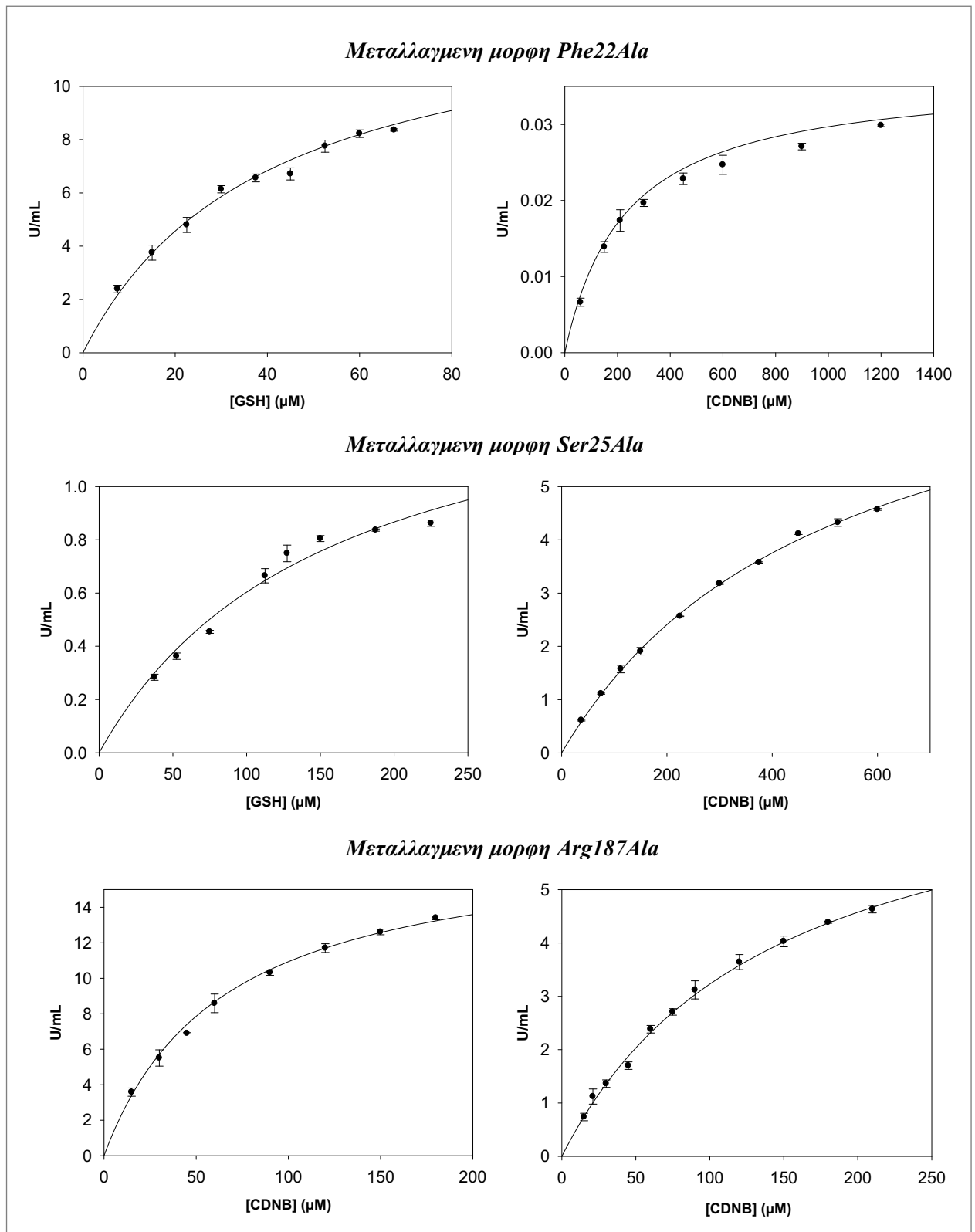
Η εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala από τη συγκέντρωση του GSH πραγματοποιήθηκε σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 6,5 που περιέχει 1 mM CDNB και GSH σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση με εύρος συγκεντρώσεων 10 έως 250 μ M. Η κινητική ανάλυση της εξάρτησης της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών από τη συγκέντρωση του CDNB πραγματοποιήθηκε σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 6,5 που περιέχει 2,5 mM GSH και CDNB σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση (10-1200 μ M). Τα πειραματικά αποτελέσματα αναλυθήκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Sigma Plot 11.0.

Η κινητική ανάλυση για το υπόστρωμα GSH πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH₂PO₄ pH 7,5 και 1mM EDTA που περιέχει 1,5 mM CuOOH και GSH σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση (5-200μM). Επίσης, η κινητική ανάλυση της εξάρτησης της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών από τη συγκέντρωση του CuOOH πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH₂PO₄ pH 7,5 και 1mM EDTA που περιέχει 1 mM GSH και το υπόστρωμα CuOOH σε ένα εύρος μεταβαλλόμενων συγκεντρώσεων 25-350μM. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων προκαλεί αναστολή των καταλυτικών αντιδράσεων.

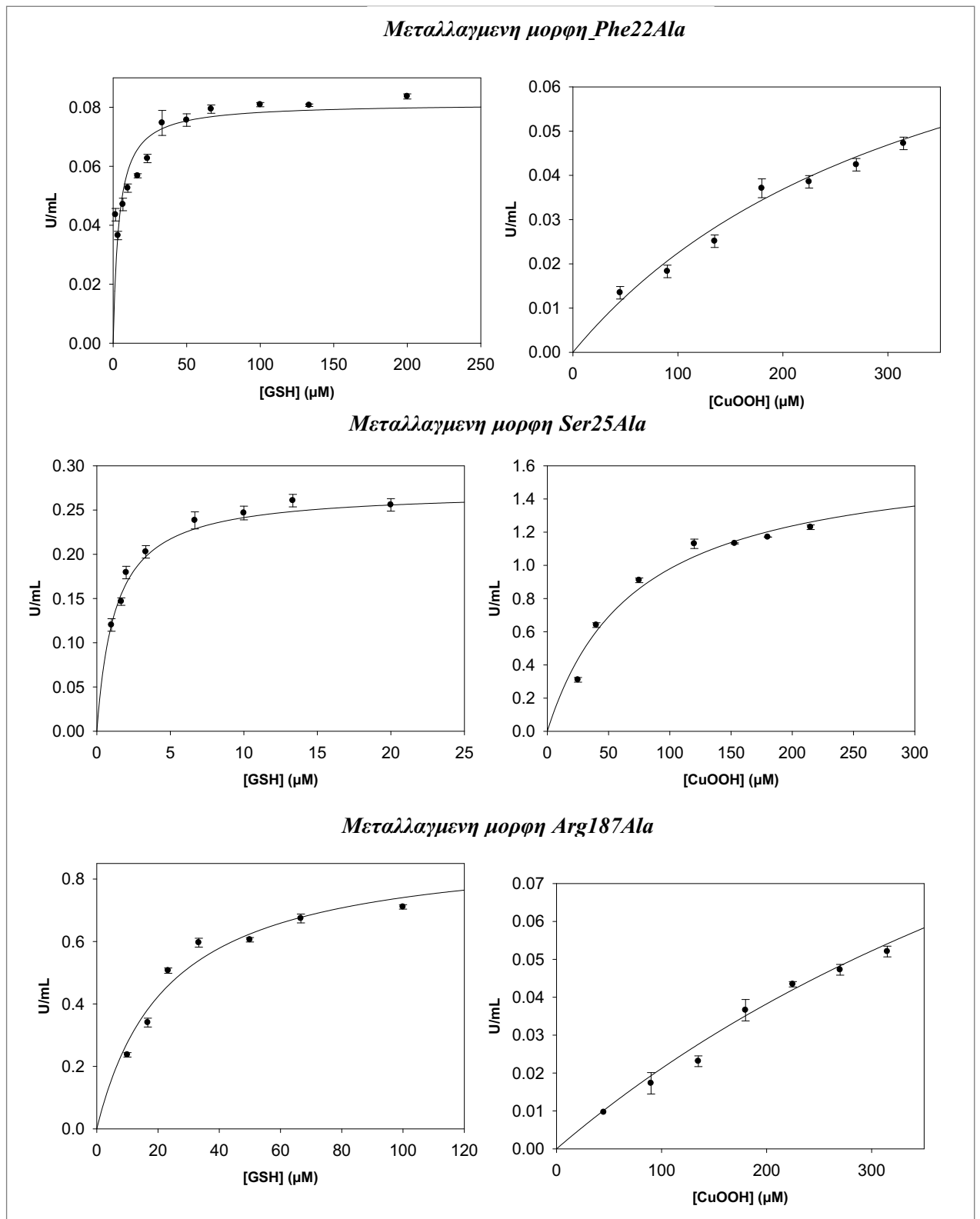
ΠΙΝΑΚΑΣ 4.10. Κινητικές σταθερές του άγριου τύπου *AtuGST4* και των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala για τα υποστρώματα GSH/CDNB και GSH/CuOOH.

Ένζυμο	K _m , (mM) (GSH)	K _m , (mM) (CDNB)	k _{cat} (% του άγριου τύπου)
Άγριος τύπος	0,30±0,03	1,5±0,09	100
Phe22Ala	0,085±0,002	3,2±0,39	90,5
Ser25Ala	0,14±0,01	1,9±0,18	78,2
Arg187Ala	0,34±0,08	7,1±0,76	33,5

Ένζυμο	K _m , (mM) (GSH)	K _m , (mM) (CuOOH)	k _{cat} (% του άγριου τύπου)
Άγριος τύπος	0,9±0,07	2,7±0,21	100
Phe22Ala	2,9±0,56	39,6±2,81	553,0
Ser25Ala	17,3±1,11	17,4±1,61	298,1
Arg187Ala	0,94±0,02	3,5±0,66	79,9



ΣΧΗΜΑ 4.43. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala ως προς τα μεταβαλλόμενα υποστρώματα GSH (5-230 μM), το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM) και το CDNB (20-1.200 μM), το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (2,5 mM).



ΣΧΗΜΑ 4.44. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala ως προς τα μεταβαλλόμενα υποστρώματα GSH (2-200 μM), το CuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1,5 mM) και CuOOH (25-320 μM), το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM).

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της κινητικής ανάλυσης των μεταλλαγμένων μορφών προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα GSH, CDNB και CuOOH. Όσον αφορά το μεταλλαγμένο ένζυμο Arg187Ala εμφανίζει δραματική μείωση στην καταλυτική του ικανότητα παρουσιάζοντας 30,8-φορές χαμηλότερη τιμή k_{cat} και 33-φορές μειωμένη τιμή k_{cat}/K_m σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η Arg187 μπορεί να συμβάλει σημαντικά στο καθοριστικό στάδιο ή στη χημεία της καταλυτικής αντίδρασης.

Στην περίπτωση του συστήματος CDNB/GSH οι μεταλλάξεις Phe22Ala και Ser25Ala παρουσίασαν μετριες διαφορές στις τιμές K_m για τα CDNB και GSH σε σύγκριση με τον άγριο τυπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις δεν αλλάζουν σημαντικά την συγγένεια της Η-θεσης για τα ηλεκτρονιοφιλα υποστρώματα. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρήθηκαν για τις τιμές k_{cat} , αν και η καταλυτική ικανότητα (k_{cat}/K_m) των ενζύμων ως προς τη GSH παρέμεινε ουσιαστικά αμετάβλητη. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις Ser24Ala και Phe21Ala παρουσίασαν μειωμένες τιμές K_m ως προς τη GSH, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κατάλοιπα αυτά συμβάλλουν στην δέσμευση και σταθεροποίηση της GSH στο ενεργό κέντρο.

Η συμπεριφορά των μεταλλαγμένων ενζύμων όταν χρησιμοποιήθηκαν τα CuOOH/GSH ως υποστρώματα, φαίνεται να είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνη που παρατηρήθηκε στο σύστημα CDNB/GSH. Οι Phe22 και Ser25 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των τιμών K_m για το CuOOH δεδομένου ότι παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στις τιμές της (6,4 έως 14,6 φορές). Αξιοσημείωτο είναι ότι και οι δύο μεταλλάξεις παρουσιάζουν επίσης σημαντική αύξηση στις τιμές k_{cat} .

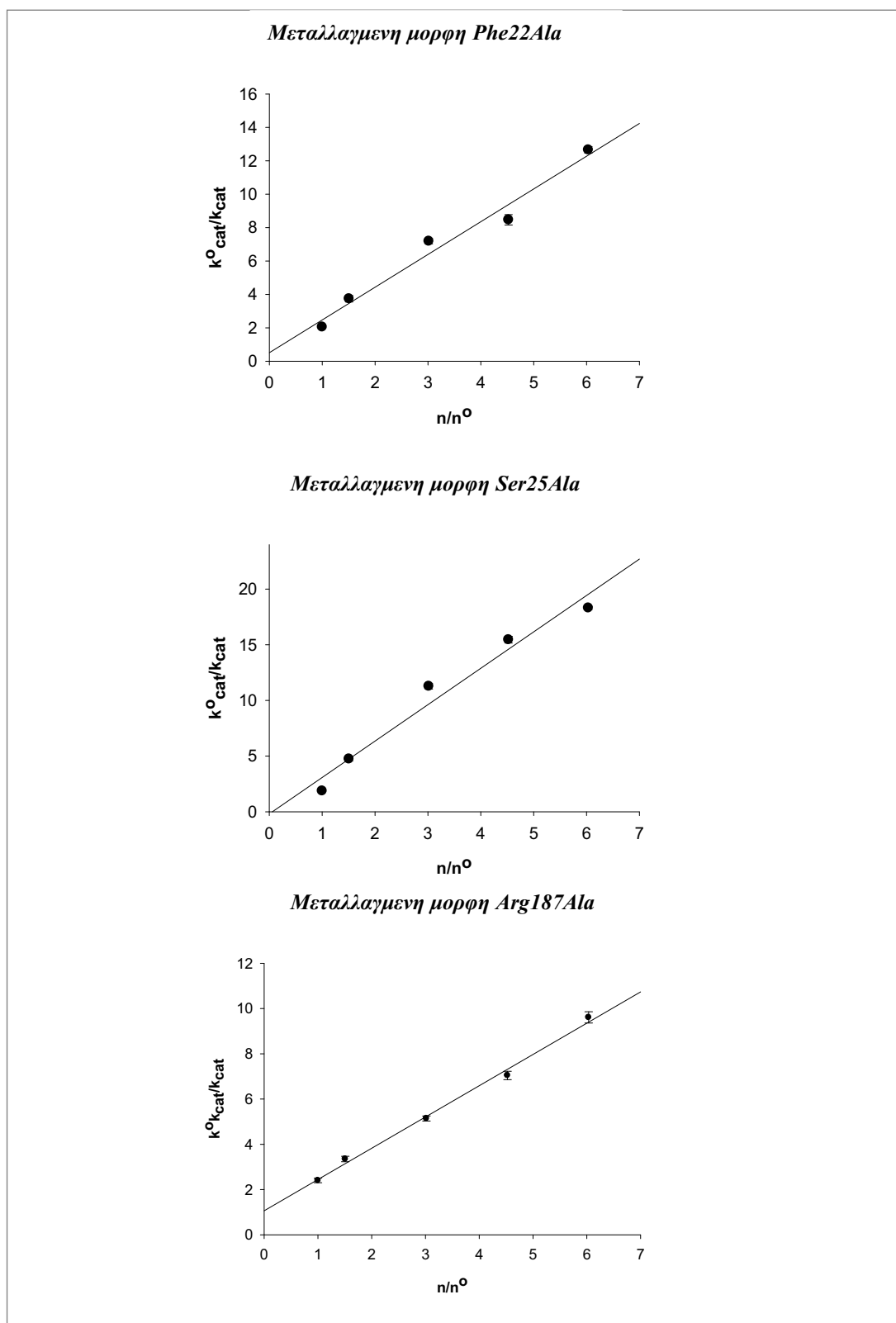
4.3.10.5. ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ *AtuGST4*.

Η επίδραση του ιξώδους στις κινητικές σταθερές των μεταλλαγμένων μορφών Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala μελετήθηκε με σκοπό να βρεθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης. Τα υποστρώματα CDNB και CuOOH χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς μεταλλαγμένων ενζύμων σε θερμοκρασία 37 °C προσθέτοντας στο ρυθμιστικό διάλυμα των αντιδράσεων διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

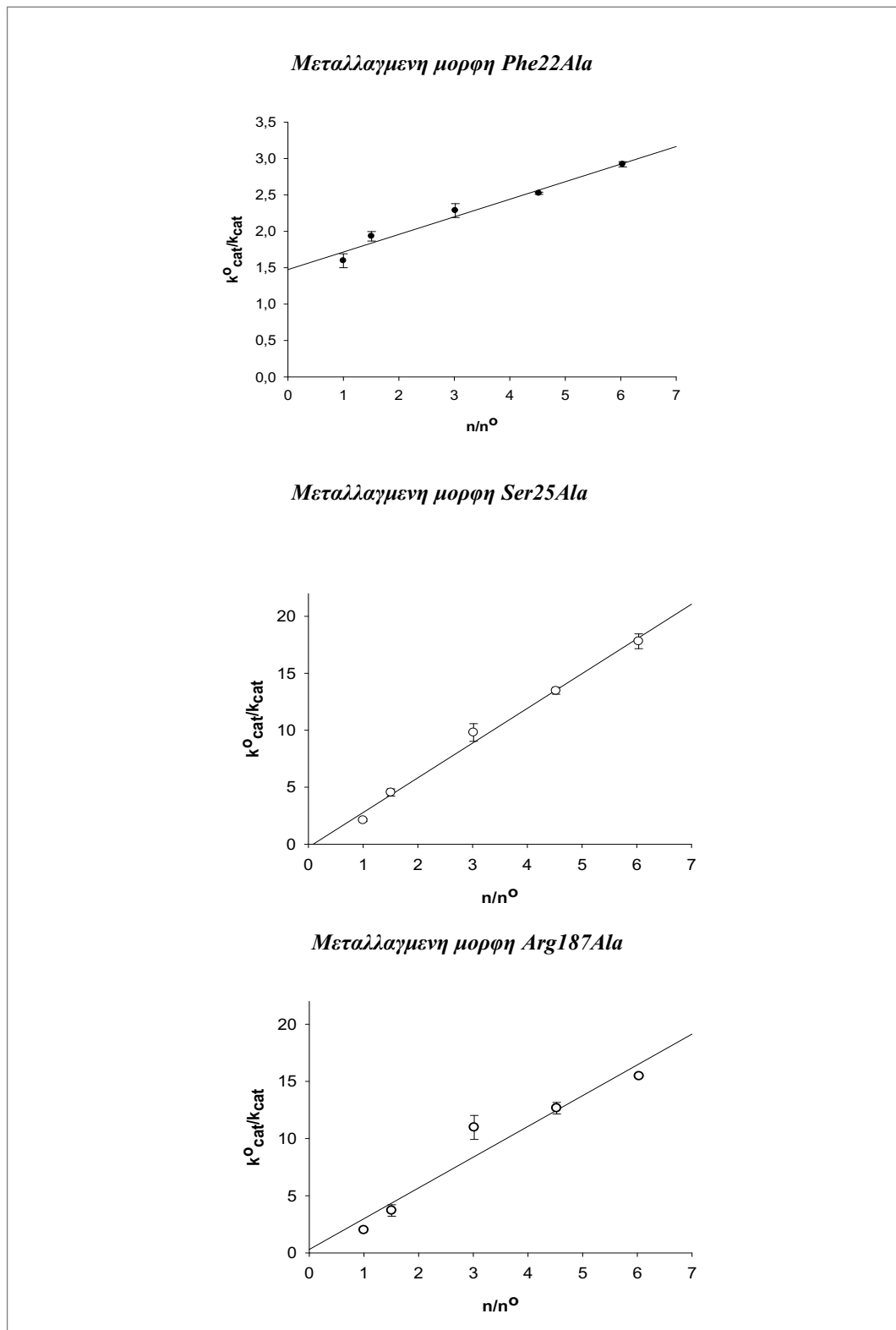
Η γραφική παράσταση k_{cat}^0/k_{cat} συναρτήσει του η/η^0 για το υπόστρωμα CDNB έδωσε ευθείες με κλίσεις $0,189 \pm 0,003$, $0,325 \pm 0,008$ και $0,140 \pm 0,005$ για τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Phe22Ala, Ser25Ala, και Arg187Ala αντιστοίχως. (Σχήμα 4.46). Σε σύγκριση με τον άγριο

τύπο *AtuGST4* (κλίση $0,151 \pm 0,003$), φαίνεται ότι οι μεταλλαγμένες μορφές *Arg187Ala* και *Phe22Ala* παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές κλίσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα *Arg187* και *Phe22Ala* πιθανότατα δεν συμμετέχουν στον καθορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης. Αντίθετα, το αμινοξικό κατάλοιπο *Ser25Ala* φαίνεται να εμπλέκεται στον προσδιορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης αφού παρουσιάζει διαφορετική κλίση σε σχέση με αυτή του άγριου τύπου.

Για το υπόστρωμα CuOOH η γραφική παράσταση της επίδραση του ιξώδους στις κινητικές σταθερές της πρωτεΐνης *AtuGST4* έδωσε ευθεία με κλίση $0,339 \pm 0,008$ (παράγραφος 4.2.4). Με σκοπό να διεξαχθούν συγκριτικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική των μεταλλαγμένων μορφών. Οι γραφικές παραστάσεις k°_{cat}/k_{cat} συναρτήσει του η/η° έδωσαν ευθείες με κλίσεις $0,263 \pm 0,003$, $0,318 \pm 0,005$, $0,271 \pm 0,002$ για τις μεταλλάξεις στις θέσεις *Phe22Ala*, *Ser25Ala* και *Arg187Ala* αντιστοίχως (Σχήμα 4.48). Το σύνολο των μεταλλαγμένων μορφών παρουσίασε παραπλήσιες τιμές κλίσης με την κλίση του άγριου τύπου. Σε γενικές γραμμές τα αμινοξικά κατάλοιπα *Arg187Ala* και *Phe22Ala* φαίνεται ότι δεν εμπλέκονται στον καθορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης οσον αφορά και τα δυο υπό μελέτη υποστρώματα. Αντίθετα η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *Ser25Ala* ενδεχομένως συμμετέχει στον προσδιορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής διαδικασίας με το υπόστρωμα CDNB.



ΣΧΗΜΑ 4.45. Η γραφική παράσταση της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} για τις μεταλλαγμένες μορφές Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala. Παρουσιάζεται η εξάρτηση του k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του η/η^0 για το υπόστρωμα CDNB. Ως παράγοντας αύξησης του ιξώδους χρησιμοποιείται η γλυκερόλη. Οι γραφικές παραστάσεις σχεδιαστήκαν με το πρόγραμμα Sigma Plot.



ΣΧΗΜΑ 4.46. Η γραφική παράσταση της επίδρασης του ιζώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} για τις μεταλλαγμένες μορφές Phe22Ala, Ser25Ala και Arg187Ala. Παρουσιάζεται η εξάρτηση του k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του n/n^0 για το υπόστρωμα CuOOH. Ως παράγοντας αύξησης του ιζώδους χρησιμοποιείται η γλυκερόλη. Οι γραφικές παραστάσεις σχεδιαστήκαν με το πρόγραμμα Sigma Plot.

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καθαρισμός, ο προσδιορισμός του κινητικού προφίλ και η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ένζυμου *AtuGST4* αποτελέσαν τα αντικείμενα μελέτης του παρόντος κεφαλαίου. Η πρωτεΐνη *AtuGST4* αποτελεί μια GST από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* C.58 και για τον λόγο αυτόν επιλεχθηκε αρχικά να εφαρμοσθεί για τον καθαρισμό της χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή που φέρει GSH ακινητοποιημένο σε αγαρόζη (BES-GSH). Η διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου με τη συγκεκριμένη μέθοδο, εξετάστηκε εφαρμόζοντας εναλλακτικά πρωτόκολλα που περιελάμβαναν παραλλαγές που αφορούσαν τις συνθήκες (τιμές pH, σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος) κατά τα στάδια της προσρόφησης, έκπλυσης του προσροφητή και έκλουσης της πρωτεΐνης. Εντούτοις, τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η πρωτεΐνη δεν προσδένεται στον προσροφητή ικανοποιητικά και εκλύεται μετά τη φόρτωση του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος κατά το στάδιο έκπλυσης του προσροφητή. Σύμφωνα με δημοσιευμένα στοιχεία, παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν οι GSTs της θ τάξης οι οποίες δεν συγκρατώνται σε στήλες χρωματογραφίας συγγένειας βασισμένες σε ακινητοποιημένα παράγωγα γλουταθειόνης (GSH-agarose, S-hexyl-GSH-agarose) τεχνική που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ενζύμων των υπολοίπων τριών τάξεων α , μ , π (Morgenstern et al., 1981, Simons and Vander Jagt, 1981). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό άλλωστε, αποτελεί και ένα από τα κριτήρια διαχωρισμού τους από τις υπόλοιπες τάξεις των ενζύμων GSTs (Meyer et al., 1991). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απόπειρα καθαρισμού του ένζυμου με χρωματογραφία συγγενείας σε μεταλλοχημικό προσροφητή NTA-αγαρόζη. Η μέθοδος καθαρισμού σε ακινητοποιημένο ιόν νικελίου έδωσε 8,04-φορές καθαρισμού και ανάκτηση περίπου 100%. Ανάλογη μέθοδος καθαρισμού χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου έχει επίσης εφαρμοσθεί για κάποιες GSTs που ανήκουν στη θ τάξη ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται και η πρωτεΐνη hGST T1-1 από άνθρωπο (Shokeer et. al, 2005).

Η κινητική μελέτη του καθαρού ένζυμου *AtuGST4* παρείχε χρήσιμες πληροφορίες για τα καταλυτικά του χαρακτηριστικά. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το άριστο pH δράσης που εμφανίζει το ένζυμο είναι κοντά στην περιοχή του 8, επιλέχθηκε ένα εύρος τιμών pH από 6,5 έως 8,3 προκειμένου να εξεταστεί η κινητική συμπεριφορά του ένζυμου έναντι του υποστρώματος CDNB. Οι τιμές pH 7,6 και 7,9 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) ενώ για την τιμή pH 7,6 παρατηρήθηκε και η χαμηλότερη K_m . Πραγματοποιήθηκε επίσης κινητική μελέτη του ένζυμου για τα υποστρώματα CuOOH, t-BuOOH και HED. Εντυπωσιακά υψηλότερες εμφανίζονται οι τιμές σταθερών εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) για τα υπεροξειδία CuOOH και t-BuOOH σε σχέση με τα υπόλοιπα υπό μελετη υποστρώματα. Μεταξύ των υπεροξειδίων, το ένζυμο φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη αγχιστεία ως προς το υπό-

στρώμα CuOOH ενώ το υπόστρωμα HED εμφανίζει συνολικά τις χαμηλότερες τιμές κινητικών σταθερών.

Η θερμική σταθερότητα του ένζυμου *AtuGST4* μελετήθηκε για δυο διαφορετικές τιμές pH 7,6 και 7,9 και οι τιμές T_m που προέκυψαν είναι $59,95 \pm 0,93$ °C και $63,33 \pm 1,12$ °C αντίστοιχα σε ένα εύρος θερμοκρασιών 37-80 °C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά k_{cat} για τα υποστρώματα CDNB και CuOOH μελετήθηκε για την περιοχή 0-40 °C. Για το υπόστρωμα CuOOH η τιμή της E_a είναι μικρότερη κατά 2,8-φορές περίπου συγκριτικά με τη τιμή της E_a για το υπόστρωμα CDNB. Οι συγκεκριμένες τιμές σε συνδυασμό με τη διαφορά στις τιμές της ΔH^\ddagger υποδηλώνουν ότι η καταλυτική αντίδραση για το υπόστρωμα CuOOH πραγματοποιείται ευκολότερα και με λιγότερη «σπατάλη» ενέργειας. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ΔH^\ddagger και E_a εκφράζουν και οι δύο τη διαφορά μεταξύ ES^\ddagger και ES σε θερμικό περιεχόμενο (Lonhienne et al., 2000). Η μείωση ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων που πρέπει να διασπαστούν για να γίνει η αντίδραση και που παρατηρείται για το υπόστρωμα CuOOH σε σχέση με το CDNB, οδηγεί σε μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης. Δομικά αυτό ερμηνεύεται με την εμφάνιση πιο εύκαμπτης δομής. Αυτή η αυξημένη ευκαμψία με τη σειρά της οδηγεί στην ύπαρξη πολλών πιθανών διαμορφώσεων ενζύμου-υποστρώματος και κατά συνέπεια σε αυξημένη εντροπία του ES συμπλόκου στην περίπτωση του CuOOH.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική συμπεριφορά του ένζυμου προκειμένου να προσδιοριστεί το στάδιο του καταλυτικού μηχανισμού που τελικά καθορίζει και την ολική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν δυο υποστρώματα, τα CDNB και CuOOH. Για τα υποστρώματα αυτά βρέθηκε πως το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με τις δομικές ανακατατάξεις της πρωτεΐνης (Johnson et al., 1993, Labrou et al., 2001).

Ξεκινώντας από τη σημαντική διαπίστωση της μη πρόσδεσης της πρωτεΐνης *AtuGST4* σε προσροφητή χρωματογραφίας συγγένειας που φέρει ακινητοποιημένο γλουταθείο, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ένζυμου αποτέλεσε μια πολύ ενδιαφέρουσα αλλά και απαραίτητη διαδικασία για την πληρέστερη κατανόηση της λειτουργίας του. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό είναι κοινό για τις τρανσφεράσες του γλουταθείου της θ τάξης και παρατηρείται σε όλες τις GSTs της τάξης αυτής που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Η κρυσταλλική δομή της υπο μελέτης πρωτεΐνης εμφανίζει τέσσερα ομοδιμερή στην ασύμμετρη μονάδα. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό σε πρωτεΐνες GSTs έχει παρατηρηθεί μόνο στην περίπτωση μιας GST που εκφράζεται σε ενήλικα σκουλήκια του στελέχους *H. polygyrus* και ανήκει σε μία νέα μη χαρακτηρισμένη τάξη GSTs (Kriksunov et al., 2003).

Η πρωτεΐνη *AtuGST4* ακολουθεί την κανονική GST αναδίπλωση με κάθε υπομονάδα να αποτελείται από δυο διακριτές δομικές περιοχές. Η N-τελική δομική περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 1-95) υιοθετεί μια τοπολογία παρόμοια με αυτή της θειορεδοξίνης (Wilce & Parker 1994, Katti et al., 1990, Martin, 1995), αποτελούμενη από τέσσερα β-ελάσματα τα οποία περιστοιχίζονται από 3 α-έλικες (Σχήμα 4.28). Η N-τελική δομική περιοχή της πρωτεΐνης *AtuGST4* εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με την πλειοψηφία των GSTs (περίπου 1-80 αμινοξικά κατάλοιπα). Η διάταξη ξεκινά με ένα N-τελικό β-έλασμα ($\beta 1$) που ακολουθείται από μια α-έλικα (H1) και από ένα δεύτερο β-έλασμα ($\beta 2$) παράλληλο στο $\beta 1$ έλασμα. Ακολουθούν δυο μικρές α-έλικες (H2, H3: 5 και 6 αμινοξικών καταλοίπων αντίστοιχα) που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως H2a και H2b. Οι συγκεκριμένες συνδέονται με τα αντιπαράλληλα β-ελάσματα $\beta 3$ και $\beta 4$ μέσω ενός βρόγχου που χαρακτηρίζεται από ένα αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης (Pro73). Το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο που χαρακτηρίζεται ως *cisPro-loop*, βρίσκεται στη λιγότερο προτιμητέα *cis* διαμόρφωση και είναι υψηλά συντηρημένο σε όλες τις GSTs. Η Pro73 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της πρωτεΐνης σε μια καταλυτικά «δεκτική» διαμόρφωση παρόλο που δεν σχετίζεται άμεσα με την κατάλυση (Allocati et al., 1999). Η τρίτη α-έλικα (H3) έλικα ενώνει την N- με τη C- τελική δομική περιοχή η οποία αποτελείται από 6 α-έλικες όπως στην περίπτωση των GSTs της α τάξης (Sinning et al., 1993), σε αντίθεση με τη C- τελική δομική περιοχή των μ , π τάξεων που περιέχει πέντε α-έλικες (Zhang et al., 1992, Reinemer et al., 1991). Η C-τελική δομική περιοχή περιέχει τα περισσότερα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το υδρόφοβο υπόστρωμα, όπως επίσης ένα υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγίνης στην H4 α-έλικα (Asn119) που αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της άλλης υπομονάδας. Διαφορές στη C-τελική δομική περιοχή μεταξύ των GSTs μπορεί να είναι υπεύθυνες για διάφορες που σχετίζονται με την εξειδίκευση του υποστρώματος (Wilce & Parker, 1994).

Η εξέλιξη στην υπεροικογένεια των GST δείχνει να προτιμά την ανάπτυξη μιας υδρόφοβης κοινής επιφάνειας μεταξύ των υπομονάδων (von Rosenvigne et al., 1995) με τις πιο πρόσφατες GST τάξεις (α , μ και π) να χαρακτηρίζονται από το υδρόφοβο μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού». Η αλλαγή στη φύση της διεπιφάνειας μπορεί να σχετίζεται με τη χαμηλή σταθερότητα της καταλυτικής περιοχής λόγω απουσίας αυτής της αλληλεπίδρασης. Οι απαραίτητες για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης *AtuGST4*, αλληλεπιδράσεις, μεταξύ της κοινής επιφάνειας των δυο μονομερών είναι υδροφοβικού χαρακτήρα. Το υδρόφοβο μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» μεταξύ των καταλοίπων της N-τελικής περιοχής του ενός μονομερούς και της C-τελικής περιοχής του άλλου μονομερούς είναι μια από τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις τέτοιου τύπου. Στην πρωτεΐνη *AtuGST4* το αμινοξικό κατάλοιπο Phe69 που βρίσκεται στον βρόγχο που προηγείται του $\beta 3$ ελάσματος λειτουργεί ως «κλειδί» το οποίο εισχωρεί σε μια υδρόφοβη «κλειδαριά» που αποτελείται κυρίως από τα αμινοξικά κατάλοιπα

των ελίκων H4 και H5 της άλλης υπομονάδας. Τα αρωματικά αμινοξέα που αναφέρονται στην παγκόσμια βιβλιογραφία και παίζουν τον ρόλο του «κλειδιού» στις διάφορες τάξεις των ενζύμων GSTs είναι κυρίως τα Phe52 στην α τάξη, Phe56 στη μ τάξη, Tyr49 στην π τάξη (Sheehan et al., 2001), Met57 στη ζ τάξη. Στις α , μ , π τάξεις το συγκεκριμένο μοτίβο είναι συντηρημένο (Kosloff et. al., 2006) ενώ στις β , φ , ω , σ , τ , θ τάξεις των GSTs το μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» εμφανίζεται σπανιότερα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τάξεις των GSTs ή εμφανίζεται με κυρίαρχες τις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συνθάση της αιματοποιητικής προσταγλανδίνης D, που ανήκει στην σ τάξη των GSTs και έχει μια υδρόφιλη διεπιφάνεια με ένα μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» παρόμοιο με αυτό που εμφανίζεται στις μ , π , α τάξεις (Kanaoka et al., 1997). Η ύπαρξη υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων φαίνεται να «προτρέπουν» σε μεγαλύτερο βαθμό την πρωτεΐνη στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν το ενεργό κέντρο.

Το χαρακτηριστικό SNAIL/TRAIL μοτίβο (Ser-Asp-Ala-Ile-Leu/Thr-Arg-Ala-Ile-Leu) στην έλικα H3 της N-τελικής δομικής περιοχής έχει παρατηρηθεί στις περισσότερες GSTs (Koonin et al., 1994) και περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα κατάλοιπα που συγκροτούν την περιοχή δέσμευσης της GSH. Για παράδειγμα η Thr-68 στο μοτίβο TRAIL δημιουργεί δυο δεσμούς υδρογόνου με την α -καρβοξυλομάδα του Gly-τμήματος της GSH μέσω της υδροξυλομάδας της και του αμιδικού αζώτου της (Sinning et al., 1993). Στην πρωτεΐνη AtuGST4 το αντίστοιχο μοτίβο είναι το SGAIIV το οποίο τοποθετείται στην έλικα H4 (αμινοξικά κατάλοιπα 85-89). Παρόμοιο μοτίβο έχει παρατηρηθεί στο μοναδικό GST ισοένζυμο (pfGST) το οποίο βρίσκεται στο παράσιτο της μαλάριας *Plasmodium falciparum*, με τη μόνη διαφορά ότι στη θέση της γλυκίνης (G) υπάρχει μια γλουταμίνη (Q).

Στις α , μ , π , σ GSTs μια συντηρημένη τυροσίνη στην N-τελική περιοχή είναι απαραίτητη για την κατάλυση η οποία πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης της φαινολικής υδροξυλομάδας της τυροσίνης με τη σουλφυλομάδα της GSH (Liu et al., 1992, Kong et al., 1992, Stenberg et al., 1991). Το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο είναι επίσης συντηρημένο σε αρκετές βακτηριακές GSTs. Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί και στις οποίες πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις, δείχνουν ότι σε κάποιες περιπτώσεις η τυροσίνη είναι πράγματι απαραίτητη στην κατάλυση (Armstrong, 1997, Wilce and Parker, 1994) ενώ σημειακές μεταλλάξεις σε GSTs που απομονώθηκαν από τα βακτήρια *E. coli* και *P. mirabilis* αποκαλύπτουν ότι η τυροσίνη στη θέση αυτή δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταλυτική διαδικασία (Nishida, et al., 1994, Casalone et al., 1998). Οι θ τάξεις GSTs από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (Reinemer et al., 1996) και την αυστραλιανή μυγα *Lucilia cuprina* (Wilce et al., 1995) στερούνται της συγκεκριμένης τυροσίνης στο ενεργό κέντρο, ενώ σημειακές μεταλλάξεις που διεξήχθησαν έδειξαν ότι ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης στην

N-τελική περιοχή εμπλέκεται στην κατάλυση (Board et al., 1995). Στη δομή αυτής της GST, μάλιστα, η τυροσίνη σε αυτή τη θέση προσανατολίζεται μακριά από το ενεργό κέντρο αντί να βρίσκεται άμεσα απέναντι από τη γλουταθειόνη ενώ η Ser9 θεωρήθηκε το καταλυτικό αμινοξύ που ενεργοποιεί την GSH (Wilce et al., 1995). Στην πρωτεΐνη *AtuGST4* το αμινοξικό κατάλοιπο Ser24 (στον βρόγχο που έπεται του β1 ελάσματος) ενδεχομένως να εμπλέκεται στον μηχανισμό απελευθέρωσης του προϊόντος και στη διαμόρφωση της N-τελικής περιοχής κοντά στο ενεργό κέντρο. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση και να διευκρινιστεί ο ρόλος του συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου στην κατάλυση, πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του Ser25 σε Ala. Η επίδραση της μετάλλαξης στην καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου αναλύεται στη συνέχεια.

Αξίζει να τονιστεί ότι προκειμένου να προσδεθεί το μόριο του αναστολέα στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης πρέπει αρχικά να λάβουν την ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση (Guida, 1994). Αυτή η διαμόρφωση παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα (η αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται όταν το μόριο του υποστρώματος μεταβαίνει από μία ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση στην οποία βρίσκεται, σε μία διαμόρφωση συμπληρωματική της διαμόρφωσης του υποδοχέα). Επομένως, προκειμένου να εντοπιστεί η ευνοϊκότερη διαμόρφωση, απαιτείται να μελετηθούν οι επιφάνειες επαφής με σκοπό να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα. Στη μελέτη αυτή, πρέπει να ληφθούν υπόψη δύο βασικές αρχές, οι οποίες έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικές τόσο για την αναγνώριση όσο και το ταίριασμα του ένζυμου με το υπόστρωμα (Kuntz, 1992). Η πρώτη αρχή είναι γνωστή ως αρχή της συμπληρωματικότητας ως προς τη μορφή-στερεοχημεία. Η μορφή των δραστικών μορίων (τουλάχιστον γεωμετρικά) είναι συμπληρωματική, και αυτό γιατί έχει παρατηρηθεί ικανοποιητικό ταίριασμα ανάμεσα στα μόρια που έρχονται σε επαφή. Η δεύτερη αρχή είναι γνωστή ως αρχή της συμπληρωματικότητας ως προς την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι υπάρχει μεγάλη χημική συμπληρωματικότητα (δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αντιδράσεις, κ.τ.λ) ανάμεσα στα μόρια που έρχονται σε επαφή (Lenhof, 1995). Παρόλο που η δεύτερη αρχή είναι η πιο σημαντική, υπάρχει η δυνατότητα αναγνώρισης πολλών μορίων ικανών να ενωθούν μόνο με τη βοήθεια της αρχής της συμπληρωματικότητας της μορφής (Mezey, 2000).

Η H-θέση του ενεργού κέντρου, όπως παρατηρήθηκε κατά την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής, περιβάλλεται από θετικά αμινοξέα αργινίνης (Arg29, Arg33, Arg184, Arg185) τα οποία συγκροτούν μια θετικά φορτισμένη περιοχή (Σχήμα 4.34). Η Arg185 αποτελεί ένα από τα αμινοξικά κατάλοιπα που συγκροτούν την H-θέση του ενεργού κέντρου και αποτέλεσε στόχο σημειακής μεταλλαξογένεσης. Σκοπός της μετάλλαξης ήταν να ερευνηθεί αν η θέση του συγκεκριμένου αμινοξέος ενδεχομένως ευθύνεται για πιθανή συμμετοχή του στον

καταλυτικό μηχανισμό. Η πλευρική ομάδα του αμινοξέος δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με όλους τους άνθρακες του φαινολικού δακτυλίου του 4-νιτροφαινυλο-τμήματος του αναστολέα σε αποστάσεις 3.47-4.5 Å (Σχήμα 4.33). Η ισχυρή αλληλεπίδραση της Arg185 με τον φαινολικό δακτύλιο του αναστολέα ενδεχομένως σταθεροποιεί τη δέσμευση αρωματικών υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο.

Οι αλληλεπιδράσεις της Phe21 με το 4-νιτροφαινυλο-τμήμα του αναστολέα ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της θέσης και του προσανατολισμού του προσδεμένου στο ενεργό κέντρο μορίου. Επίσης, το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο πιθανότατα να επηρεάζει τη διαμόρφωση της H2 α-έλικας, γιατί παρόλο που δεν ανήκει σε αυτή βρίσκεται σε άμεση επαφή με αμινοξικά της κατάλοιπα. Οι H2 έλικες στις GSTs έχουν υψηλή δομική ευκαμψία (Ricci et al., 1996). Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής σε GST της σ τάξης έδειξε ότι η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα εύκαμπτη από στοιχεία που προέκυψαν μελετώντας τον μέσο όρο θερμικών συντελεστών (Ji et al., 1995). Επίσης η συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει ιδιαίτερη ευκαμψία απουσία υποστρωμάτων και στην π τάξη (Vega et al., 1998, Oakley et al., 1998).

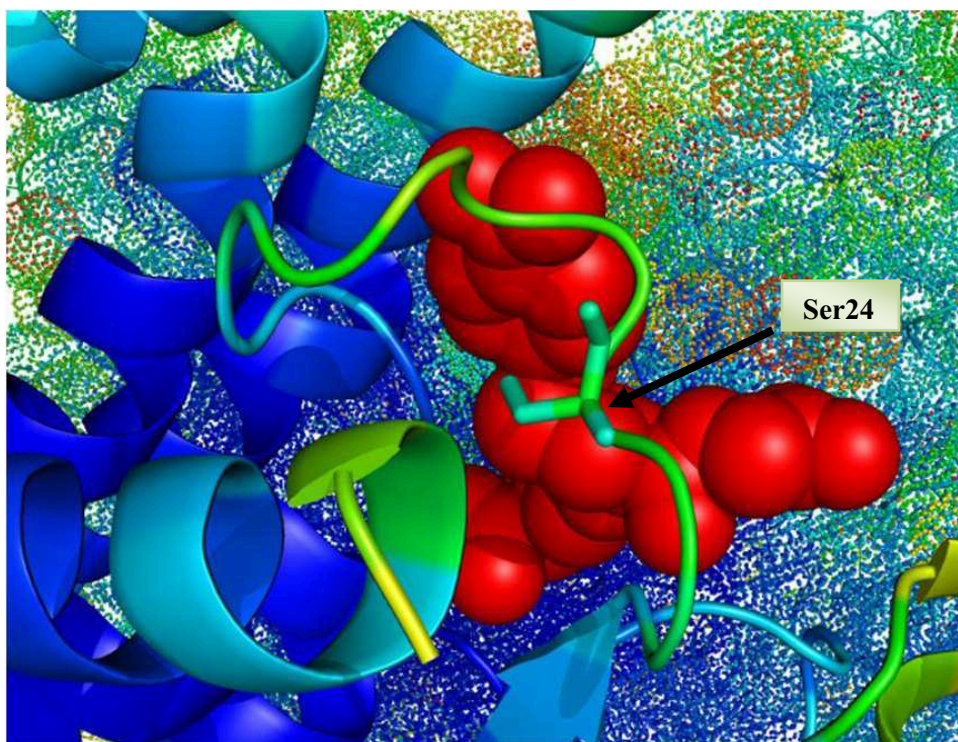
Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση της πρωτεΐνης *AtuGST4* και με τη μέθοδο quick change PCR προκληθήκαν σημειακές μεταλλάξεις στα αμινοξικά κατάλοιπα Phe22 και Ser25 τα οποία μετατραπήκαν σε Ala. Για τη μετάλλαξη του Arg187 σε Ala εφαρμόστηκε η μέθοδος επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (Παράγραφος 4.3.10.1). Η μετάλλαξη των τριών συνολικά αμινοξέων (Phe22, Ser25, Arg187) βασίστηκε στη ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ένζυμου και αποσκοπούσε στην αποσαφήνιση του ρόλου των καταλοίπων στη διαδικασία του καταλυτικού μηχανισμού. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν οδήγησαν σε συγκριτικά συμπεράσματα μεταξύ των ενζύμων συμπεριλαμβανομένου και του άγριου τύπου. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη με ακινητοποιημένο νικέλιο (Ni²⁺) και η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για ο καθαρισμό του άγριου τύπου (παράγραφος 2.4.17). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του καθαρισμού η ανάκτηση που επιτεύχθηκε για τη μεταλλαγμένη μορφή Phe22Ala (45,37%) είναι αρκετά χαμηλή συγκριτικά με τα ποσοστά ανάκτησης των μεταλλαγμένων ενζύμων Ser25Ala και Arg187Ala (98,12% και 87,63% αντίστοιχα). Ωστόσο, η εικόνα της ηλεκτροφορητικής αποτύπωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών (Σχήμα 4.43) αποκαλύπτει υψηλή καθαρότητα για το σύνολο των ενζύμων.

Όσον αφορά την κινητική μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών, πραγματοποιήθηκε αρχικά κινητική ανάλυση των ενζύμων ως προς τα υποστρώματα GSH και CDNB. Η μεταλλαγμένη μορφή Arg187Ala παρουσίασε αξιοσημείωτη μείωση στις τιμές σταθερών εξειδίκευσης

(k_{cat}/K_m) για τα GSH και CDNB σε σχέση με τον άγριο τύπο. Η ταυτόχρονη αύξηση στις τιμές της K_m σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, διαφοροποίησε σε μεγάλο βαθμό την κινητική συμπεριφορά της πρωτεΐνης Arg187Ala σε σχέση με τα μεταλλαγμένα ένζυμα Phe22Ala και Ser25Ala τα οποία δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές. Από τα παραπάνω γίνεται φανερή η άμεση συμμετοχή του καταλοίπου Arg187 στον καταλυτικό μηχανισμό, στη δέσμευση του GSH και στη σταθεροποίηση του ενεργού κέντρου.

Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών των μεταλλαγμένων μορφών και του άγριου τύπου πραγματοποιήθηκε και για τα υποστρώματα CuOOH/GSH. Για το υπόστρωμα CuOOH για το οποίο η πρωτεΐνη *AtuGST4* εμφανίζει αυξημένη ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το πρότυπο υπόστρωμα των GSTs το CDNB, οι μεταλλαγμένες μορφές Phe22 και Ser25 παρουσιάζουν δραματικές μεταβολές στις τιμές της σταθεράς εξειδίκευσης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την σημαντική αύξηση στις κινητικές σταθερές K_m και k_{cat} φανερώνουν ότι τα δυο αμινοξικά κατάλοιπα πιθανότατα εμπλέκονται στον μηχανισμό δέσμευσης του υπεροξειδίου CuOOH. Αναλυτικότερα, λόγω της μετατροπής του ογκώδους αμινοξέος Phe22, που βρίσκεται στο κάτω μέρος της H θέσης, σε Ala ενδεχομένως αναπροσαρμόζονται η παύουν να υφίστανται οι αλληλεπιδράσεις τόσο με το ενεργό κέντρο όσο και με την H2 α -έλικα. Πιθανότατα, επομένως, επηρεάζουν τη δέσμευση του υπεροξειδίου καθώς είναι δυνατό να προκαλείται αναδιοργάνωση της δομής στη συγκεκριμένη περιοχή.

Σχετικά με το αμινοξικό κατάλοιπο Ser25, παρατηρούμε ότι βρίσκεται στον βρόγχο μήκους 12 αμινοξικών καταλοίπων που συνδέει το $\beta 1$ έλασμα με την H1 έλικα. Ο συγκεκριμένος βρόγχος φράζει την είσοδο στην H-θέση του ενεργού κέντρου και όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.47 παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα και ευκαμψία (υψηλοί B συντελεστές). Η μετάλλαξη Ser25Ala πιθανότατα να μεταβάλλει τη διαμόρφωση του βρόγχου με συνακόλουθη επίδραση στην πρόσδεση του υποστρώματος αλλά και την απελευθέρωση του προϊόντος της κατάλυσης.



ΣΧΗΜΑ 4.47. Παρουσίαση της θέσης του αμινοξικού καταλοίπου Ser24 της Η θέσης του ενεργού κέντρου της υπομονάδας Α. Η Ser24 τοποθετείται στο βρόγχο που συνδέει το β1 έλασμα με την Η1 α-έλικα και ο οποίος εμποδίζει την είσοδο στην Η θέση του ενεργού κέντρου. Οι δυο υπομονάδες χρωματίζονται με βάση τους Β συντελεστές που εμφανίζουν, με μπλε χρώμα αναπαρίστανται οι χαμηλότεροι Β συντελεστές (και ακολουθούν κατά αυξανόμενο βαθμό οι γαλάζιοι, πράσινοι και κίτρινοι). Επομένως ο βρόγχος στον οποίο βρίσκεται η Ser24 είναι ιδιαίτερα εύκαμπτος (πράσινο χρώμα). Το μόριο του αναστολέα παρουσιάζεται με κόκκινες σφαίρες Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα PyMOL (Delano, 2002).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του ιξώδους στις κινητικές σταθερές των μεταλλαγμένων μορφών έτσι ώστε να αναλυθεί η συνεισφορά των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο καθοριστικό στάδιο (rate limiting step) και στη χημεία της καταλυτικής αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα της μελέτης όπως αυτά αναλύονται στην παράγραφο 4.3.10.5, η Ser24 φαίνεται να εμπλέκεται στον καθορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης όσον αφορά το υπόστρωμα CDNB, ενώ για το CuOOH διαπιστώνουμε ότι το συγκεκριμένο κατάλοιπο δεν φαίνεται να επηρεάζει την κατάλυση. Ο ρόλος επομένως που παίζει η Ser25 στην κατάλυση φαίνεται να είναι σημαντικός μόνο για μερικά συγκεκριμένα δεύτερα υποστρώματα. Η δομή του ένζυμου ενδεχομένως τροποποιείται με το CuOOH ως δεύτερο υπόστρωμα τονίζοντας έτσι ότι αλλά αμινοξέα μπορεί να συμμετέχουν στην κατάλυση. Άλλωστε, οι υψηλοί Β-συντελεστές του βρόγχου στον οποίο τοποθετείται το κατάλοιπο της σερίνης, αποκαλύπτουν την αρκετά μεγάλη ευλυγισία του συγκεκριμένου δομικού

στοιχείου (Σχήμα 4.47). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη σημαντική θέση του βρόγχου σε σχέση με την Η-θέση του ενεργού κέντρου, καθιστούν τη μετάλλαξη Ser25Ala σημαντική για τη διαδικασία της κατάλυσης παρουσία του υποστρώματος CDNB. Σημειακές μεταλλάξεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε GSTs της θ και ζ τάξης αλλά και από το στέλεχος *Ochrobacterium anthropi* αποδεικνύουν την ύπαρξη μιας συντηρημένης σερίνης κοντά στο ενεργό κέντρο που εμπλέκεται στην κατάλυση (Favaloro et al., 1998).

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών συσχέτισης της μεταβολής του ιζώδους και της κινητικής συμπεριφοράς των ενζύμων διαπιστώθηκε ότι τα κατάλοιπα Arg187Ala και Phe22Ala δεν εμπλέκονται στον καθορισμό του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης. Συνεπώς, οι δομικές μεταβολές εκατέρωθεν της Η-θέσης του ενεργού κέντρου ενδεχομένως συνεισφέρουν στον καταλληλότερο προσανατολισμό και την αποτελεσματικότερη δέσμευση του υποστρώματος ή ακόμη επηρεάζουν την απελευθέρωση των προϊόντων από το ενεργό κέντρο.

Η προσπάθεια κατανόησης του καταλυτικού μηχανισμού της πρωτεΐνης *AtuGST4* και της ερμηνείας του με βάση τα δομικά στοιχεία του ένζυμου υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη διαφοροποιείται από άλλες βακτηριακές GSTs. Το ένζυμο μοιάζει περισσότερο με τις ευκαρυωτικές GSTs της θ τάξης καθώς εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται κυρίως στη συγκεκριμένη τάξη των GSTs. Η μη δέσμευση της πρωτεΐνης σε στήλες χρωματογραφίας συγγένειας βασισμένες σε ακινητοποιημένα παράγωγα γλουταθειόνης (GSH-agarose, S-hexyl-GSH-agarose) αποτελεί ένα από αυτά. Γονίδια από ένζυμα παρόμοια με αυτά της θ τάξης είναι ευρέως διάσπαρτα στη φύση, βρίσκονται σε βακτήρια, ζύμη, φυτά, έντομα και άλλες πηγές (Pemble & Taylor, 1992). Επιπλέον, η υπό εξέταση πρωτεΐνη εμφανίζει δραστικότητα ως προς το CDNB αλλά κυρίως ως προς το υπεροξειδίο του κουμενίου. Κατ'αντιστοιχία πρέπει να τονιστεί ότι κοινό χαρακτηριστικό των GSTs θ τάξης είναι η συγγένεια που εμφανίζουν έναντι υδρουπεροξειδίων. Δυο GSTs της θ τάξης η GST 5-5 και GST 5*-5* που απομονώθηκαν από αρουραίο βρέθηκε ότι αποτοξινώνουν DNA υδρουπεροξειδία (Tan et al., 1988). Η GST Yrs-Yrs, εμφανίζει δραστικότητα έναντι υδρουπεροξειδίων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Hiratsuka et al., 1994) ενώ το CuOOH, έδειξε να αποτελεί ένα άριστο υπόστρωμα για την GSTT2-2 (Hussey & Hayes, 1992).

Για αυτόν τον λόγο, η δραση υπεροξειδάσης που εμφανίζει η πρωτεΐνη *AtuGST4*, ενισχύει περαιτέρω την άποψη ότι κύριος ρόλος της πιθανότατα είναι η προστασία των κυττάρων από οξειδωτική καταπόνηση και ενδεχομένως δρα ως μέρος του προστατευτικού μηχανισμού των οργανισμών υπό συνθήκες καταπόνησης. Τέλος, όσον αφορά την ενζυμική δραστικότητα έναντι του CDNB, κάποιες GSTs της θ τάξης παρουσιάζουν δραστικότητα ως προς το συγκεκρι-

κριμένο υπόστρωμα (π.χ όπως αυτή από το μπρόκολο, Lopez et al., 1994), αποκλείοντας ως απόλυτο κριτήριο ταξινόμησης μιας πρωτεΐνης στη θ τάξη την έλλειψη ενζυμικής δραστηριότητας ως προς το CDNB, το οποίο κυριαρχούσε μέχρι πρόσφατα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Μοριακή και κινητική ανάλυση
των ενζύμων *GmGSTU2-2* και
GmGSTU10-10

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι GSTs αρχικά ανακαλύφθηκαν σε ζώα τη δεκαετία του 1960 λόγω του σημαντικού ρόλου που διαδραμάτιζαν στον μεταβολισμό των φαρμάκων (Booth et al., 1961). Η παρουσία τους στα φυτά εντοπίστηκε λίγο αργότερα το 1970, όταν μια GST από αραβόσιτο εμφάνισε ενζυμική δραστικότητα υπεύθυνη για τη σύζευξη της ατραζίνης με τη γλουταθειόνη, προστατεύοντας την καλλιέργεια από το συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο (Fregar & Swanson, 1970).

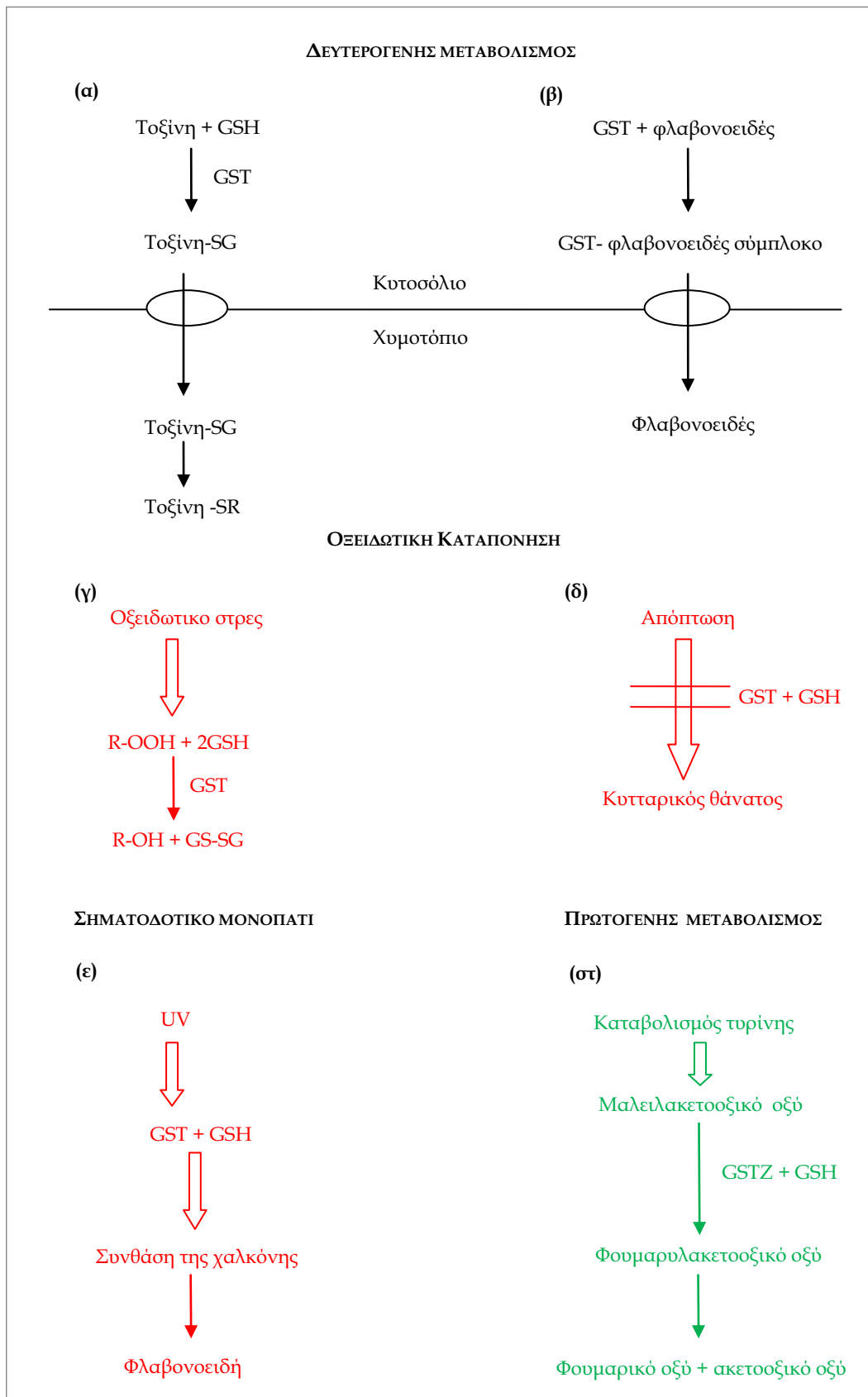
Η οικογένεια των φυτικών GSTs υποδιαιρείται σε οχτώ τάξεις, επτά από τις οποίες [(ϕ , τ , ζ , θ , λ , ομάδα πρωτεϊνών με δράση αναγωγάσης της αφυδροασκορβάσης (DHAR) και απαλογογνάσης της τετραχλωρο-υδροκινόνης (TCHQD)] είναι διαλυτές και μια είναι μικροσωμιακή. Η κατανομή των ενζύμων GSTs οι οποίες ανήκουν στις προαναφερθείσες τάξεις, σε ορισμένα φυτικά είδη, παρουσιάζεται, στον Πίνακα 5.1. Τον μεγαλύτερο αριθμό GST ισοενζύμων εμφανίζει το ρύζι (συνολικός αριθμός GSTs 59) με αφθονότερο αντιπρόσωπο την τ τάξη. Ακολουθούν το φυτικό είδος *Arabidopsis italiana* που περιλαμβάνει 54 συνολικά GSTs και το σιτάρι με δυο λιγότερους αντιπροσώπους. Από τις συνολικά οχτώ φυτικές τάξεις, η τ τάξη είναι αυτή που περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό ενζύμων GSTs σε όλα τα φυτικά είδη. Εξαιρεση αποτελεί το σιτάρι, στο οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των GSTs προέρχεται από την ϕ τάξη. Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 271 ένζυμα GSTs έχουν ανακαλυφθεί σε φυτά. Εκτός από τα φυτικά είδη που έχουν ήδη αναφερθεί ο αραβόσιτος, η σόγια και το *Triticum tauschii* (αγρία ποικιλία σιταριού) αποτελούν μερικά ακόμη είδη φυτών στα οποία συναντούμε ένζυμα GSTs.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1. Κατανομή των GSTs σε διάφορα φυτικά είδη.

Φυτικά Είδη	φ	τ	θ	ζ	DHAR	λ	TCHQD	Μικροσωμιακές	Σύνολο
Αραβίδοξη (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	13	28	2	2	4	3	1	1	54
Σιτάρι (<i>Triticum</i>)	25	8	9	10	—	—	—	—	52
Κολοκύθα (<i>Curcubita pepo</i>)	1	3	—	—	—	—	—	—	4
Αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>)	12	28	—	2	—	—	—	—	42
Σόγια (<i>Glycine max</i>)	4	20	—	1	1	—	—	—	26
Αγριοσίταρο (<i>Triticum tauschii</i>)	6	8	—	—	1	1	—	—	16
Αλεπονουρά (<i>Alopecurus myosuroides</i>)	1	—	—	—	—	—	—	—	1
Τομάτα (<i>Lycopersicon</i>)	—	5	—	—	—	—	—	—	5
Σινάπι (<i>Brassica juncea</i>)	1	—	—	—	—	—	—	—	1
Ρύζι (<i>Oryza</i>)	16	40	—	2	1	—	—	—	59
Σπανάκι (<i>Spinacia</i>)	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Τριφύλλι (<i>Medicago truncatula</i>)	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Μπρόκολο (<i>Brassica oleracea italica</i>)	—	—	1	—	—	—	—	—	1
Ελαιοκράμβη (<i>Brassica napus</i>)	—	—	—	3	—	—	—	—	3
Καπνός (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	1	3	—	—	—	—	—	—	4
Πεύκο (<i>Pinus tabulaeformis</i>)	—	1	—	—	—	—	—	—	1

Οι GSTs ήδη από το 1970 εδραιώθηκαν ως αποτοξινωτικά ένζυμα φάσης II. Στη φάση I οι χημικές ουσίες τροποποιούνται ώστε να αποτελέσουν εύκολο στόχο για ένα ή περισσότερα ενζυμικά συστήματα της φάσης II. Η φάση II της αποτοξίνωσης σχετίζεται με τη διαδικασία σύζευξης κατά την οποία ένα προστατευτικό συστατικό δεσμεύεται σε μια τοξική ουσία. Η αντίδραση σύζευξης είτε απενεργοποιεί την τοξική ουσία είτε την μετατρέπει σε μια άλλη μορφή. Επιπλέον συμμετέχουν σε πολλές ακόμη απαραίτητες για την ανάπτυξη και εξέλιξη λειτουργίες των φυτών. Καταλύουν τη νουκλεόφιλη σύζευξη της GSH με ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Στα φυτά, το συζευγμένο προϊόν απορροφάται στο χυμοτόπιο ή μεταφέρεται στον αποπλάστη (Grzam et al., 2006, 2007, Ohkama-Ohtsu et al., 2007a, Ferretti et al., 2009). Οι GSTs των φ και τ τάξεων, οι οποίες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αφθονία και ευρεία εξειδίκευση στα φυτά, είναι αυτές που κυρίως εμπλέκονται στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ενώσεων. Η ζ και θ τάξης GSTs παρουσιάζουν πολύ περιορισμένη ενζυμική δραστηριότητα έναντι ξενοβιοτικών ουσιών. Επιπλέον, οι θ τάξης GSTs εμφανίζουν δράση υπεροξειδάσης και συμμετέχουν σε διαδικασίες οξειδωτικής καταπόνησης, σε

αντίθεση με της ζ τάξης GSTs που δρουν ως ισομεράσες και καταλύουν την μετατροπή του μαλεϊλακετοοξικού οξέος σε φουμαρυλακετοοξικό (Fernandez-Canon et al., 1998). Οι GSTs της ζ τάξης παίρνουν επίσης μέρος στον καταβολισμό της τυροσίνης (Thom et al., 2001). Οι DHAR και λ τάξης GSTs λειτουργούν ως θειολτρανσφεράσες (Edwards & Dixon, 2005). Οι μικροσωμιακές GSTs αποτελούν μέλη της οικογένειας MAPEG (μεταβολισμός εικοσανοειδών λιπαρών οξέων και γλουταθειόνης) (Jakobsson et al., 1999). Μια πληθώρα μελετών εφαρμόζοντας τόσο πρωτεωμικές όσο και γενωμικές μεθόδους έχουν σταθεί αρωγοί στο να αποκαλυφθεί η λειτουργική ποικιλότητα αυτών των ενζύμων. Το σύνολο των λειτουργιών που επιτελούν στα φυτά τα ένζυμα GSTs παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 5.1.



ΣΧΗΜΑ 5.1. Λειτουργίες GST στα φυτά. (α) στο δευτερογενή μεταβολισμό οι GSTs λειτουργούν μέσω σύζευξης ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων με τη γλουταθειόνη, τα συζευγμένα μόρια μεταφέρονται στη συ-

νέχεια στο χυμοτόπιο με τη βοήθεια ABC μεταφορέων (στο σχήμα παριστάνονται με κύκλους) πριν τη διαδικασία της πρωτεόλυσης, (β) μερικές GSTs της φ και τ τάξης επίσης απαιτούνται για τη μεταφορά φλαβονοειδών χρωστικών στο χυμοτόπιο (κόκκινο χρώμα). Ο ρόλος των GSTs στον οξειδωτικό μεταβολισμό περιλαμβάνει: (γ) δράση ως υπεροξειδάσες του γλουταθείου που μπορούν να μειώσουν τα υδρουπεροξειδία των λιπών, (δ) αντιοξειδωτικό ρόλο προστατεύοντας από την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο και (ε) συμμετοχή στο σύστημα σηματοδότησης καταπονήσεων παίζοντας ρόλο στην επαγωγή της συνθάσης της χαλκόνης μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος οι ζ τάξης GSTs (GSTZ) συμμετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό ως μαλειλακετοοξικές ισομεράσες. Τα πλατιά τόξα στο σχήμα υποδηλώνουν διαδικασία επαγωγής. Τα λεπτά τόξα δείχνουν ενζυμικές αντιδράσεις. Οι λεπτές κόκκινες οριζόντιες γραμμές υποδηλώνουν αναστολή της αντίδρασης.

Οι πρωτεΐνες *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* οι οποίες μελετώνται στο παρόν κεφάλαιο προέρχονται από το φυτό σόγια και ανήκουν στην τάξη τ των GSTs (Παράγραφος 2.1.2). Αναφερόμενοι στη διεθνή βιβλιογραφία, οι McGonigle et al. (2000), ταυτοποίησαν και μελέτησαν GST αλληλουχίες από σόγια (*Glycine max*). Εντόπισαν 25 GSTs στη σόγια οι οποίες αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των εκπεφρασμένων GSTs στο συγκεκριμένο φυτικό είδος. Σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης των Droog et al. (1995), στη σόγια βρέθηκαν 4 GSTs τύπου I, 1 GST τύπου II και 20 GSTs τύπου III συμπεριλαμβανομένων αυτών που έχουν ήδη περιγραφεί στη διεθνή λογοτεχνία (Ulmasov et al., 1995, Andrews et al., 1997, McGonigle and O'Keefe, 1998, Skipsey et al., 2000). Οι GSTs που εντοπίστηκαν στη σόγια παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.

Στην ίδια μελέτη επίσης παρατηρήθηκε ότι ο αραβόσιτος, ένα μονοκοτυλήδονο φυτό, περιέχει παρόμοιο αριθμό γονιδίων τύπου I και τύπου III ενώ η σόγια, ένα δικοτυλήδονο φυτό, έχει σαφώς μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων τύπου III παρά τύπου I (McGonigle et al., 2000). Παρολαυτά, η παρατήρηση αυτή δεν αποκαλύπτει μία αποδεδειγμένη διαφορά ανάμεσα σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά αφού στη δικοτυλήδονη Αραβίδοψη (*Arabidopsis*) η πλειοψηφία των (δημοσιευμένων) GSTs είναι τύπου I (Marrs, 1996). Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το σιτάρι, ένα εξαπλοειδές φυτό, που περιέχει πολύπλοκη ομάδα από GSTs, φαίνεται να έχει περίπου ίδιο αριθμό GSTs τύπου I και τύπου III (B. McGonigle and D.P. O'Keefe, unpublished data). Αυτό που θα μπορούσε να πει κανείς με μεγαλύτερη σιγουριά, είναι ότι οι GSTs Τύπου II φαίνεται να αποτελούν «φτωχούς» αντιπροσώπους των φυτικών ενζύμων αφού εμφανίζονται σε μεμονωμένα γονίδια (2 στον αραβόσιτο και 1 στη σόγια) και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης (μόνο το 2%–4% μεμονωμένων cDNAs αντιπροσωπεύει τις GSTs τύπου II). Ανάμεσα στα φυτικά είδη, έχουν κλωνοποιηθεί GSTs τύπου II και από γαρύφαλλο (Meyer et al., 1991, Itzhaki and Woodson, 1993).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2. Οι GSTs που έχουν εντοπιστεί στη σόγια (*Glycine max*).

ΤΥΠΟΣ	ΟΝΟΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ NCBI
Τύπος I GSTs	<i>GmGSTU21</i>	AF243376
	<i>GmGSTU22</i>	AF243377
	<i>GmGSTU23</i>	AF243378
	<i>GmGSTU24</i>	AF243379
Τύπος II GSTs	<i>GmGSTU25</i>	AF243380
Τύπος III GSTs	<i>GmGSTU1</i>	J03197, M20363
	<i>GmGSTU2</i>	Y10820
	<i>GmGSTU3</i>	X68819
	<i>GmGSTU4</i>	AF048978
	<i>GmGSTU5</i>	AF243360
	<i>GmGSTU6</i>	AF243361
	<i>GmGSTU7</i>	AF243362
	<i>GmGSTU8</i>	AF243363
	<i>GmGSTU9</i>	AF243364
	<i>GmGSTU10</i>	AF243365
	<i>GmGSTU11</i>	AF243366
	<i>GmGSTU12</i>	AF243367
	<i>GmGSTU13</i>	AF243368
	<i>GmGSTU14</i>	AF243369
	<i>GmGSTU15</i>	AF243370
	<i>GmGSTU16</i>	AF243371
	<i>GmGSTU17</i>	AF243372
	<i>GmGSTU18</i>	AF243373
	<i>GmGSTU19</i>	AF243374
	<i>GmGSTU20</i>	AF243375

Ο ρόλος ορισμένων GSTs της τ τάξης από σόγια στην αποτοξίνωση από ζιζανιοκτόνα παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.3. Η *GmGSTU5* εμφανίζει την υψηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με όλα τα ένζυμα έναντι της σουλφονουλουρίας, (chlorimuron ethyl). Η πιο άφθονα κατανεμημένη *GmGSTU8* από σόγια, εμφανίζει σαφώς μικρότερη δραστικότητα (δραστικότητα μικρότερη του 1/10 της δραστικότητας του *GmGST5*) έναντι του chlorimuron ethyl. Αυτό πιθανότατα δείχνει ότι τα πιο δραστικά ένζυμα (έναντι ενός συγκεκριμένου ξενοβιοτικού υποστρώματος) μπορεί να μην είναι αυτά που είναι πρωταρχικά υπεύθυνα για τον μεταβολισμό.

Οι GSTs τύπου III στη σόγια, *GmGST4*, *GmGSTU10*, και *GmGSTU2* διαφέρουν σε επίπεδο αμινοξικό <11,5%. Παρολαυτά, οι δραστικότητες τους ποικίλλουν δραματικά. Μια άλλη GST από την ίδια ομάδα, εμφανίζει την υψηλότερη δραστικότητα με καθένα από τα υποστρώματα alachlor, atrazine, και ethacrynic acid. Η διαφορά μεταξύ του πιο δραστικού και

του λιγότερο δραστικού ενζύμου στις GSTs τύπου III στη σόγια είναι τουλάχιστον 20-φορές, γεγονός που πιθανότατα αποκαλύπτει τον σημαντικό ρόλο που παίζουν συγκεκριμένα αμινοξέα στην εξειδίκευση του υποστρώματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3. Δραστικότητα GST ενζύμων της τ τάξης από σόγια για επτά διαφορετικά υποστρώματα (McGonigle et al., 2000).

GST τ τάξης από σόγια	Ουρά 6-His	Chlorimuron ethyl	Alachlor	Atrazine	CDNB	Εθακρινικό οξύ	Οξείδιο του στιλβενίου	1,2-εποξυ-3-(ρ -νιτροφαινοξυ) προπάνιο
<i>GmGSTU1</i>	-	0,5	104	0,13	6.030	8	7,93	33
<i>GmGSTU2</i>	✓	0,5	8	0,76	1.379	4	0,07	9
<i>GmGSTU4</i>	-	0,5	71	0,03	1.924	109	0,06	22
<i>GmGSTU5</i>	✓	4,4	168		14.364	1	0,07	20
<i>GmGSTU6</i>	✓	0,1	1	0,19	2.364	13	0,06	1
<i>GmGSTU7</i>	✓	0,2	10	1,40	515	17	4,04	12
<i>GmGSTU8</i>	✓	0,3	111	0,46	2.545	14	0,12	10
<i>GmGSTU9II</i>	✓	0,9	30	0,00	2.576	68	0,16	10
<i>GmGSTU10</i>	✓	1,4	166	0,00	2.030	11	0,06	4
<i>GmGSTU11</i>	✓	0,1	0	0,00	45	9	0,00	1
<i>GmGSTU12</i>	✓	0,1	7	0,03	470	14	0,02	47
<i>GmGSTU13</i>	✓	0,1	4	0,03	1.394	13	0,49	19

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι GSTs συνήθως έχουν μοριακές μάζες μεγέθους 50 kDa και συντίθενται είτε από δυο πανομοιότυπες (ομοδιμερές) είτε από δυο διαφορετικές (ετεροδιμερές) πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Συμφωνά με τους Edwards και Dixon, (2005), οι ϕ , τ , θ και ζ τάξης GSTs είναι διμερείς πρωτεΐνες και διαθέτουν ένα κατάλοιπο σερίνης στην ενεργή περιοχή. Οι DHAR (ομάδα πρωτεϊνών με δράση αναγωγής της αφυδροασκορβάσης) και οι λ τάξης GSTs διαφέρουν από αυτά τα ένζυμα εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι μονομερή και έχουν μια καταλυτική κυστεΐνη στην ενεργή περιοχή. Η TCHQD πρωτεΐνη διαθέτει μια σερίνη στην ενεργή περιοχή. Εντούτοις, δομικές λεπτομέρειες των φυτικών μικροσωματικών GSTs δεν είναι ακόμη διαθέσιμες. Όσον αφορά τις GSTs της ϕ και τ τάξης μπορούν να σχηματίζουν διμερή ακόμη και αν περιλαμβάνουν υπομονάδες των οποίων η αμινοξική ακολουθία είναι κάπως διαφορετική (Dixon et al. 2002b). Η ικανότητα των GSTs να σχηματίζουν ετεροδιμερή αυξάνει σημαντικά την ποικιλότητα τους στα φυτά.

Από δομικής άποψης δεν είναι ξεκάθαρο αν ένα ετεροδιμερές μιας φυτικής GST έχει διαφορετική εξειδίκευση από τις υπομονάδες που το απαρτίζουν αφού καθένα από τα δύο ενεργά κέντρα σχηματίζεται αποκλειστικά από την υπομονάδα του διμερούς στο οποίο ανήκει. Επιπλέον, δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία που να αποδεικνύουν μια μορφή συνεργασίας (θετική ή αρνητική) ανάμεσα στις υπομονάδες του ετεροδιμερούς μεταξύ των φυτικών GSTs. Ο αριθμός των πιθανών ετεροδιμερών στις φυτικές GSTs είναι πολύ μεγάλος και ως εκ τούτου και

το εύρος των πιθανών εξειδικεύσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σόγια η οποία έχει 25 ομοδιμερή και 300 πιθανά ετεροδιμερή.

Είναι ενδιαφέρον να αναρωτηθεί κανείς γιατί υπάρχουν τόσες πολλές διαφορετικές GSTs σε ένα μόνο είδος δεδομένου ότι οι εξειδικεύσεις ως προς τα υποστρώματα φαίνεται να αλληλοεπικαλύπτονται. Ο αριθμός των GSTs μπορεί απλά να αντικατοπτρίζει την διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού και της ανασυναρμολόγησης των εξονίων που οδηγεί στην γονιδιακή ποικιλότητα και όχι στην ανάγκη συγκεκριμένες GSTs να εκπληρώνουν συγκεκριμένους ρόλους. Από την άλλη πλευρά, έχουμε πολύ περιορισμένες γνώσεις σχετικά με τα ενδογενή υποστρώματα των GSTs και μπορεί να είναι αυτές οι ενώσεις που εμφανίζουν σαφώς υψηλότερες ειδικές δραστηριότητες με μια δεδομένη GST. Προκειμένου να οδηγηθούμε σε ολοκληρωμένα συμπεράσματα, ίσως είναι σημαντικό να μελετήσουμε την επίδραση ορισμένων περιβαλλοντικών συνθηκών πάνω σε διαφορετικές φυτικές GSTs, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης αλλοχημικών και ξενοβιοτικών. Από πρακτική σκοπιά, η ποικιλομορφία των GSTs και οι διαφορές που παρουσιάζουν σε ειδικές μορφές και επίπεδα έκφρασης μεταξύ διαφορετικών ειδών επέτρεψε την ανάπτυξη πολλών επιλεκτικών ζιζανιοκτόνων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη σύγχρονη γεωργία.

5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1. ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ GSTs

Για την έκφραση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) τα οποία μετασηματίστηκαν με τον ανασυνδυασμένο φορέα pEXP5-CT/TOPO[®] και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB (θερμοκρασία επώασης 37°C) εμβολιασμένες με αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Ως επαγωγέας έκφρασης χρησιμοποιείται ο ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης IPTG. Μετά το πέρας της διαδικασίας έκφρασης, τα κύτταρα συλλέγονται (περίπου 0,15 g υγρής πάστας κυττάρων/50 mL καλλιέργειας) με φυγοκέντριση (8000 rpm) για 15 min και διατηρούνται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν (αναλυτική περιγραφή της μεθόδου αναφέρεται στην παράγραφο 2.4.13.).

5.2.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ GSTs ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ BES-GSH

Για τον καθαρισμό των ισοενζύμων GST χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα-GSH-Sepharose-CL6B (BES-GSH). Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των βέλτιστων συνθηκών καθαρισμού των πρωτεϊνών

που αφορούν το pH και τις συνθήκες έκλουσης των ενζύμων. Σε κάθε στάδιο του καθαρισμού υπολογίζεται η ενζυμική δραστηριότητα με τη φωτομετρική μέθοδο (παράγραφος 2.4.14.1). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (παράγραφος 2.4.11). Το πρωτόκολλο καθαρισμού αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.4.16.

5.2.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με βάση τις μεθόδους ενζυμικού προσδιορισμού που περιγράφονται στην παράγραφο 2.4.19 μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων: GSH, CDNB, fluorodifen, t-BuOOH και CuOOH. Στα γραφήματα της κινητικής ανάλυσης εμφανίζονται τα σφάλματα που προέκυψαν από την επανάληψη των πειραματικών μετρήσεων και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος SigmaPlot.

5.2.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ.

Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι του υποστρώματος CDNB σε θερμοκρασιακό εύρος από 0-45°C υπό τις συνθήκες του φωτομετρικού προσδιορισμού των ισοενζύμων GST (παράγραφος 2.4.19.1). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις Arrhenius και Eyring και προέκυψαν οι γραφικές παραστάσεις $\ln V_{\max}$ και $\ln k_{\text{cat}}$ συναρτήσει του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας ($1/T$).

5.2.5. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΞΩΔΟΣ.

Η επίδραση του ιξώδους εκτιμήθηκε στους 37 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0,1 M), pH 6,5 που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Οι τιμές του ιξώδους (η) στους 37 °C υπολογίστηκαν όπως περιγράφουν οι Wolf et al. (1985).

5.2.6. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Με σκοπό να υπολογιστούν οι τιμές T_m της πρωτεΐνης μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των ενζύμων για το εύρος θερμοκρασιών 20-70 °C. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει επώαση ενζυμικών δειγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (20 mM), pH 7 για χρονικό διάστημα 5 min. Ακολουθεί υπολογισμός της υπολείπουσας δραστηριότητας

των δειγμάτων εφαρμόζοντας τη φωτομετρική διαδικασία που αναλύεται στην παράγραφο 2.4.19.1.

5.2.7. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ V_{max} ΑΠΟ ΤΟ pH.

Η εξάρτηση της V_{max} από το pH προσδιορίστηκε με μέτρηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, 0,1 M) σε ένα εύρος τιμών από 6-8,5. Ο υπολογισμός της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού (παράγραφος 2.4.19.1) διατηρώντας σταθερά τη συγκέντρωση του υποστρώματος CDNB και την ποσότητα του ενζύμου.

5.2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΠΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.

Η μέθοδος βασίζεται στην αναστολή της αντίδρασης του συστήματος CDNB/GSH που καταλύει το ένζυμο παρουσία εντομοκτόνου ή ζιζανιοκτόνου. Το μίγμα επώασης τελικού όγκου 1 mL περιέχει 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, ένζυμο (0,02 U) και ποσότητα εντομοκτόνου ή ζιζανιοκτόνου συγκέντρωσης 0,1 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό καλίου 0,1 M, pH 6,5. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα που όμως δεν περιέχει το ένζυμο. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά και υπολογίζεται η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm (παράγραφος 2.4.19.1).

5.2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IC_{50} ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΠΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.

Ο προσδιορισμός των τιμών IC_{50} της αναστολής των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* πραγματοποιήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις των ξενοβιοτικών ενώσεων alachlor, λ-cyhalothrin, fenvalerate, permethrin, DDT και spirodichlofen.

Το μίγμα επώασης περιείχε: 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, ένζυμο και διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε ξενοβιοτική ένωση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5 τελικού όγκου 1 mL. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340 nm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα απουσία ενζύμου.

5.2.10. ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Για την ενίσχυση της περιοχής που κωδικοποιούν τα γονίδια *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* χρησιμοποιήθηκαν 50 ng cDNA από *Glycine max*, 10 pmole από τον καθένα από τους δύο εκκινητές (Πίνακας 5.2) και 0,2 mM από καθένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο

(dNTPs) σε τελικό όγκο 50μl. Ως DNA πολυμεράση χρησιμοποιήθηκε η Pfu extended (3U/μl) σε τελική συγκέντρωση 1Unit και ρυθμιστικό διάλυμα PCR της εταιρείας Promega.

Οι κύκλοι της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής του γονιδίου είναι οι ακόλουθοι: η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 95°C για 2 min. Ακολούθησαν 30 κύκλοι των 1.5 min στους 95°C (αποδιάταξη), 2 min στους 55°C (υβριδισμός εκκινητών) και 2 min στους 72°C (επιμήκυνση). Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκαν στους 72°C για 20 min. Η επιλογή του συγκεκριμένου θερμοκρασιακού προγράμματος έγινε λαμβάνοντας υπόψη μια σειρά από παραμέτρους που παρατίθενται παρακάτω. Μετά την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης, τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v).

5.2.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΟΓΟΝΟΪΟΝΤΩΝ.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη προσδιορισμού της δραστικότητας και της αναστολής της ενζυμικής δράσης με τη μέθοδο προσδιορισμού των αλογονοϊόντων όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.19.10. Οι ξενοβιοτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών είναι τα: atrazin, π-νιτροφαινυλ-GSH, endosulphan, permethrin και fenvalerate (αναστολείς) και τα υποστρώματα CDNB, IDNB, 1,2-DBE,alachlor, metolachlor και π-νιτροφαινυλ-γλωρίδιο. Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη σε θερμοκρασία 37°C.

5.2.12. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΟΓΟΝΟΪΟΝΤΩΝ.

Με σκοπό να αναλυθεί η κινητική συμπεριφορά του ενζύμου, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος CDNB σε εύρος τιμών 0-220 μM, καθώς και της πρωτεΐνης σε τιμές από 0 έως 50 μg/mL στην ενζυμική δραστικότητα με βάση τον φωτομετρικό προσδιορισμό που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.18.11. Με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου (0-75 min) στην παραγωγή αλογονοϊόντων διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του ενζύμου (0,01mg/mL) και του υποστρώματος CDNB (σταθερή συγκέντρωση κορεσμού 1mM). Τα αποτελέσματα επεξεργαστήκαν με το πρόγραμμα SigmaPlot 11.0.

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

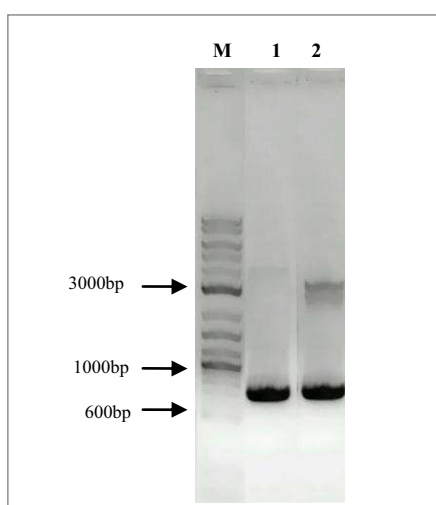
5.3.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Για την πολλαπλή αντιγραφή των γονιδίων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα cDNA από *Glycine max* (Axarli et al., 2008). Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της πολυμεράσης Pfu extended (3U/μl) σε τελική συγκέντρωση 1Unit και εκκινητών οι οποίοι σχεδιάστηκαν όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2. Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR παρουσιάζεται στην παράγραφο 5.2.10. Μετά την ολοκλήρωση των PCR αντιδράσεων, τα προϊόντα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) (Σχήμα 5.2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.4. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ισοένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*.

Εκκινητές	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')
<i>GmGSTU2-2</i>	ATGGCAGATGAGGTGGTTCTG
<i>GmGSTU10-10</i>	ATGACAGATGAGGTGGTTCTT

Στα προϊόντα PCR που παρήχθησαν, παρατηρήθηκαν δυο ζώνες κατάλληλου μεγέθους (651 bp και 669bp είναι το μέγεθος των γονιδίων του *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντιστοίχως), οι οποίες ήταν και οι αναμενόμενες. Η απόδοση της PCR ήταν ικανοποιητική (συγκέντρωση τελικού προϊόντος ~20 ng/μl), αρκετή για την αντίδραση TOPO κλωνοποίησης που ακολούθησε για την εισαγωγή των προϊόντων PCR στον φορέα pEXP5-CT/TOPO®.



ΣΧΗΜΑ 5.2. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Ως δείκτης μοριακών

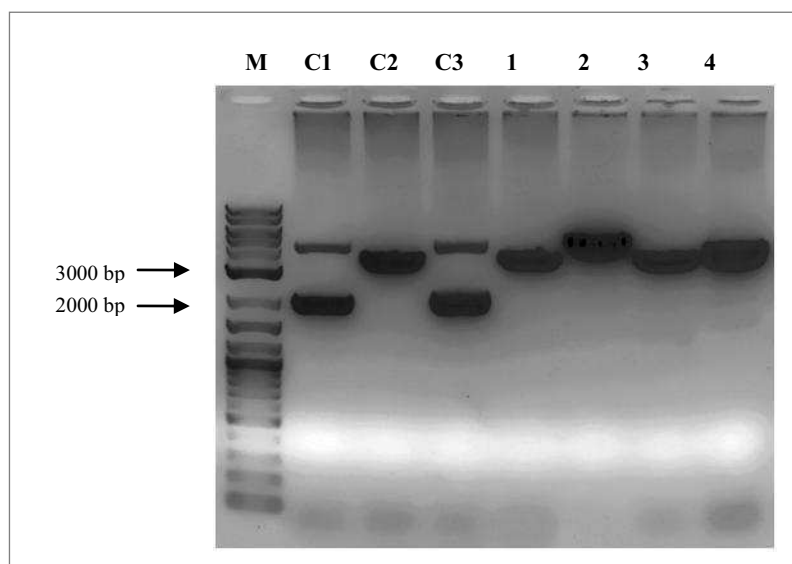
βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA Ladder (M). **Θέση 1:** το προϊόντα PCR του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *GmGSTU2-2*, **Θέση 2:** το προϊόντα PCR του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *GmGSTU10-10*. Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.

Τα προϊόντα PCR παρήχθησαν με την πολυμεράση Pfu extended η οποία έχει την ιδιότητα να προσθέτει στο τέλος της αντιγραφής αδενίνη και να συντίθενται έτσι μόρια DNA που να φέρουν στο 3'-άκρο τους επιπλέον νουκλεοτίδια αδενίνης. Επίσης, το γραμμικό TOPO πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση του γονιδίου διαθέτει στα 3'-άκρα του προεξέχουσες θυμίνες. Τα χαρακτηριστικά αυτά διευκολύνουν την αύξηση της αποτελεσματικότητας της κλωνοποίησης, διότι τα προεξέχοντα αυτά νουκλεοτίδια υβριδίζονται λόγω συμπληρωματικότητας.

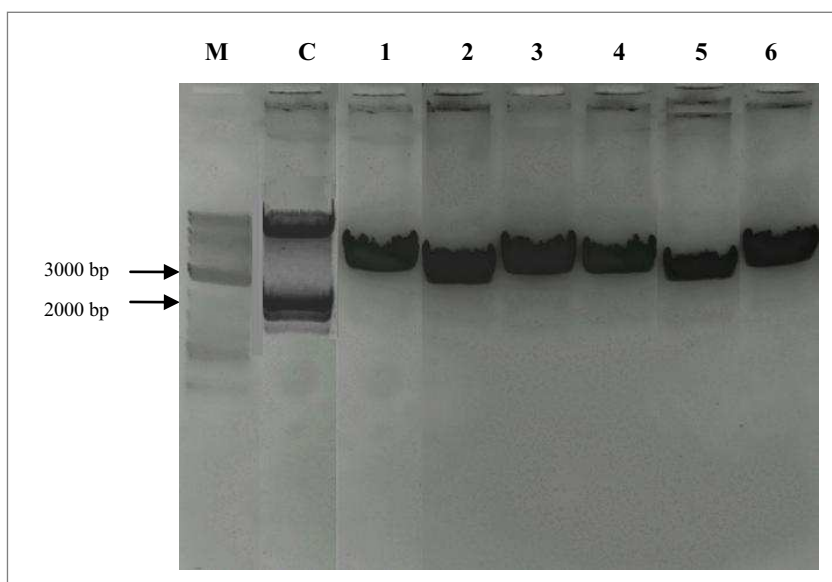
Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* TOP10 (παράγραφος 2.4.2) με τη μέθοδο του μετασχηματισμού (transformation). Η επιλογή των θετικών κλώνων έγινε σε τριβλύα LB με μάρτυρα επιλογής αμικικιλίνη στα οποία αναπτύχθηκαν πολλές αποικίες. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο.

Στη συνέχεια, μονές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη στους 37 °C για 16 h υπό συνεχή ανάδευση. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (παράγραφος 2.4.3).

Για τον έλεγχο ύπαρξης του κατάλληλου προσανατολισμού της ένθεσης στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού SphI και XbaI (παράγραφος 2.4.5). Με βάση τους χάρτες περιορισμού του φορέα pEXP5-CT/TOPO® και των γονιδίων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* και λαμβάνοντας υπόψη τα μεγέθη τους, οι φορείς που φέρουν τα γονίδια δίνουν μετά την πέψη δυο ζώνες μεγέθους 3.233 bp και 103 bp για το γονίδιο *GmGSTU2-2* και δυο ζώνες μεγέθους 3290bp και 79bp για το γονίδιο *GmGSTU10-10*. Οι φορείς που δεν φέρουν ένθεση δίνουν μία μόνο ζώνη. Τα αποτελέσματα της πέψης παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.3 για την πρωτεΐνη *GmGSTU2-2* και στο Σχήμα 5.4 για την πρωτεΐνη *GmGSTU10-10*.



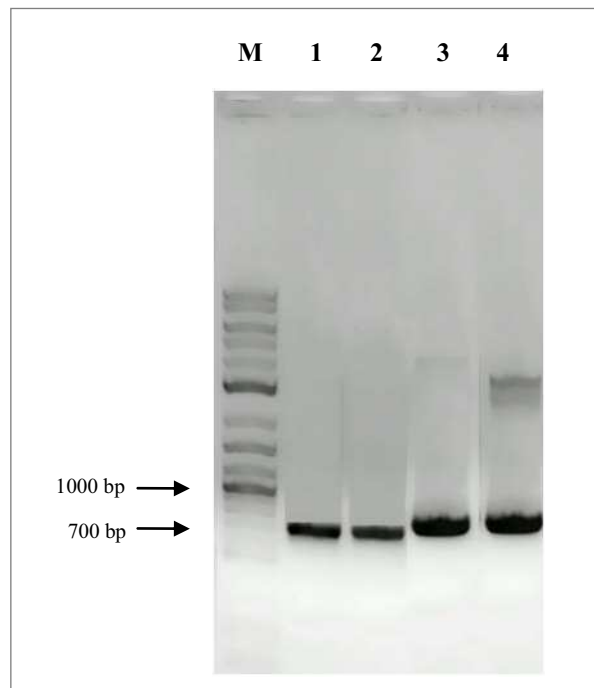
ΣΧΗΜΑ 5.3. Τα αποτελέσματα της πέψης για το γονίδιο της *GmGSTU2-2*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο λ DNA (**M**). Στη **θέση C1** είναι ο φορέας πριν την πέψη, στη **θέση C2** ο φορέας μετά από πέψη με το *XbaI*, στη **θέση C3** μετά από πέψη με το *SphI*, στις **θέσεις 2, 4** φορείς που φέρουν την ένθεση ενώ στις **θέσεις 1, 3** φορείς που δεν φέρουν την ένθεση (μη ανασυνδυασμένοι φορείς). Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.



ΣΧΗΜΑ 5.4. Τα αποτελέσματα της πέψης για το γονίδιο της *GmGSTU10-10*. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο λ DNA (**M**). Στη **θέση C** είναι ο φορέας πριν την πέψη, στη **θέσεις 2, 5** φορείς που φέρουν την ένθεση ενώ στις **θέσεις 1, 3, 4, 6** μη ανασυνδυασμένοι φορείς. Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.

Η ύπαρξη της ένθεσης στα ανασυνδυασμένα γονίδια στον πλασμιδιακό φορέα pEXP5-CT/TOPO® ελέγχθηκε περαιτέρω μέσω PCR αντιδράσεων. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το πλασμιδιακό DNA των αποικιών των ανασυνδυασμένων γονιδίων, εκκινητές οι T7 forward (που βρίσκεται πάνω στον πλασμιδιακό φορέα πριν τη θέση ένθεσης του προϊόντος PCR) και οι αντίστροφοι εκκινητές RGmGSTU2-2 του γονιδίου *GmGSTU2-2* και RGmGSTU10-10 του γονιδίου *GmGSTU10-10*. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε είναι ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική αντίδραση PCR. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή α-γαρόζης επιβεβαίωσε τα αναμενόμενα μεγέθη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (~ 730 bp για το *GmGSTU2-2* και ~750 bp για το *GmGSTU10-10*).

Στη συνέχεια και με βάση την εικόνα των αποτελεσμάτων από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA (Σχήμα 5.5), επιλέχθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έφεραν την ένθεση με τον σωστό προσανατολισμό. Ακολούθησε μετασχηματισμός των θετικών πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) με σκοπό την έκφραση των γονιδίων (παράγραφο 2.4.16) σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη. Μετά το πέρας της έκφρασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε η λύση τους με επίδραση υπερήχων.



ΣΧΗΜΑ 5.5. Ανάλυση σε πηκτή α-γαρόζης 1% (w/v) των αντιδράσεων PCR για τον έλεγχο του προσανατολισμού της ένθεσης. Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA Ladder (M). Στις **θέσεις 1, 2** είναι τα προϊόντα PCR των κλώνων 2, 4 του ενζύμου *GmGSTU2-2* και στις **θέσεις 3, 4** τα προϊόντα PCR των κλώνων 2, 5 του ενζύμου *GmGSTU10-10*. Οι αριθμοί αριστερά της εικόνας αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών σε αριθμό βάσεων.

Στα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας ως προς το υπόστρωμα CDNB (παράγραφος 2.4.19.1). Επίσης μετρήθηκε η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης (παράγραφος 2.4.10). Από τα αποτελέσματα αυτά προσδιορίστηκε η ειδική δραστηριότητα (S.A.), με βάση την οποία επιλέχθηκαν δυο κλώνοι. Ο κλώνος 4 από την πρωτεΐνη GmGSTU2-2 και ο κλώνος 5, από την GmGSTU10-10, οι οποίοι και καθαρίστηκαν μέσω χρωματογραφίας συγγένειας στον προσροφητή BES-GSH όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.16.

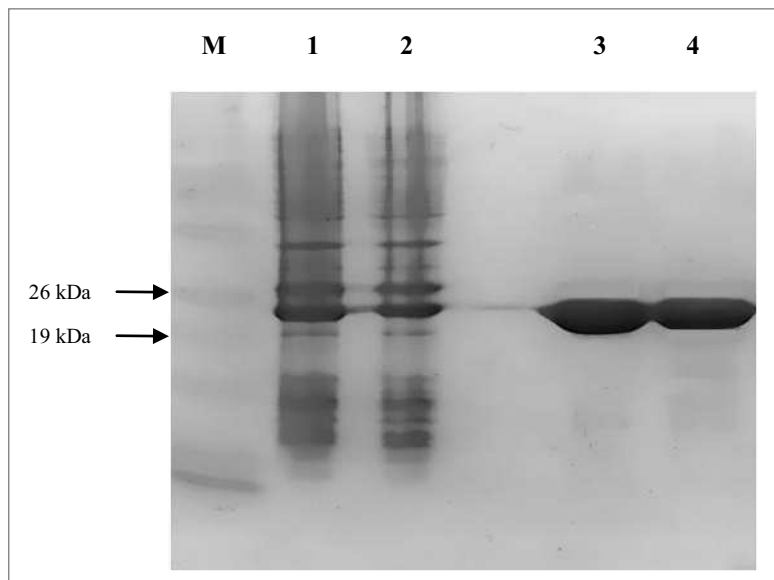
5.3.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10* ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.

Για τον καθαρισμό των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή που φέρει GSH ακινητοποιημένο σε αгарόζη (BES-GSH, παράγραφος 2.4.16). Μετά την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) και τη συλλογή τους ακολούθησε λύσιμο με επίδραση υπερήχων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια έγινε δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας το φωτομετρικό προσδιορισμό του ενζύμου όπως αυτός περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.19.1. Επίσης, μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 2.4.10). Το ενζυμικό εκχύλισμα φορτώνεται στη χρωματογραφική στήλη που περιέχει 1 mL προσροφητή. Ο προσροφητής πριν τη χρωματογραφική διαδικασία εξισορροπείται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου κατάλληλης συγκέντρωσης και pH όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.16. Αφού περάσει το ενζυμικό εκχύλισμα (1 mL) από τη στήλη, ο προσροφητής πλένεται με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης, ώστε να απομακρυνθούν το μη-προσροφημένο στη στήλη υλικό και οι χαλαρά δεσμευμένες πρωτεΐνες. Η έκλυση του προσροφημένου ενζύμου πραγματοποιείται με 10 mM GSH διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης. Συλλέγονται κλάσματα του 1 mL και γίνεται έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 2.4.19.1) και προσδιορισμός της πρωτεΐνης (παράγραφος 2.4.10).

Τα αποτελέσματα καθαρισμού των ενζύμων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5. Η καθαρότητα του ενζύμου εκτιμήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδου (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) (Σχήμα 5.6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.5. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή BES-GSH των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*.

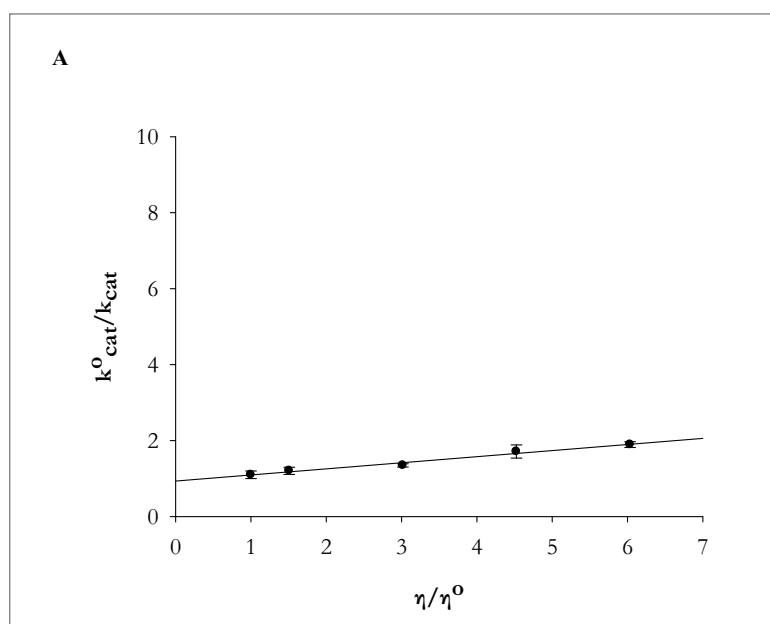
Ένζυμο	Στάδιο	Ενζυμικές μονάδες (Units)	Ειδική δραστηριότητα	Καθαρισμός (φορές)	Απόδοση (%)
<i>GmGSTU2-2</i>	Ακατέργαστο εκχύλισμα	5,18	2,34	1	
	Χρωματογραφία συγγένειας	5,18	26,94	11,51	100
<i>GmGSTU10-10</i>	Ακατέργαστο εκχύλισμα	6,02	1,53	1	
	Χρωματογραφία συγγένειας	6,02	32,70	21,37	100

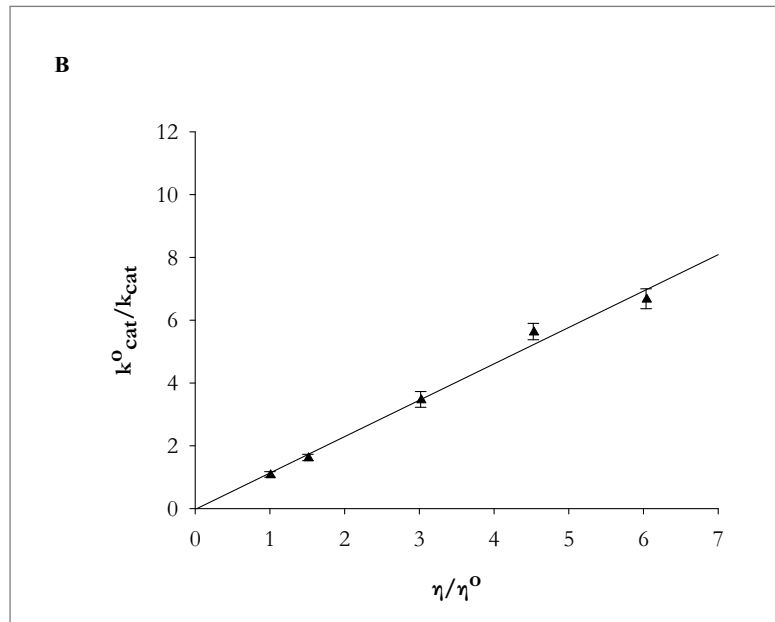


ΣΧΗΜΑ 5.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (12,5% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. **Θέση M:** μάρτυρας μοριακής μάζας (Protein Market Broad Range), **θέσεις 1,2:** ακατέργαστο εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pEXP5-CT/TOPO® στον οποίο έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντίστοιχα μετά από προσθήκη IPTG κατά την έκφραση, **θέσεις 3, 4** ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των καθαρών πρωτεϊνών *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντίστοιχα που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας με προσροφητή BES-GSH. Με τα βέλη στα αριστερά παρουσιάζονται οι θέσεις και οι μοριακές μάζες των μαρτύρων.

5.3.3. ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10*.

Το καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* μελετήθηκε μέσω της επίδρασης του ιξώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} για το υπόστρωμα CDNB στους 37 °C, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 4.3.7. Η γραφική παράσταση k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του η/η^0 για το υπόστρωμα CDNB έδωσε γραφική εξάρτηση του ιξώδους με κλίσεις $0,157 \pm 0,007$ και $1,106 \pm 0,007$ για τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντιστοίχως (Σχήμα 5.7). Για το ένζυμο *GmGSTU10-10* φαίνεται πως το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με την απελευθέρωση του προϊόντος της αντίδρασης αφού η κλίση βρίσκεται πολύ κοντά στη μονάδα, ενώ για το ένζυμο *GmGSTU2-2* που η κλίση του πλησιάζει το μηδέν το καθοριστικό στάδιο πιθανότατα συνδέεται με τη χημεία της αντίδρασης ή με κάποια μη ελεγχόμενη από τη διάχυση δομική ανακατάταξη της πρωτεΐνης (Johnson et al., 1993, Labrou et al., 2001).





ΣΧΗΜΑ 5.7. Παρουσιάζεται η επίδραση του ιζώδους στην κινητική σταθερά k_{cat} (A) για το ένζυμο *GmGSTU2-2* και (B) για το ένζυμο *GmGSTU10-10*. Οι γραφικές παραστάσεις του k_{cat}^0/k_{cat} έναντι του η/η^0 προέκυψαν μετά από πειραματικές μετρήσεις χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το CDNB σε pH 6,5 στους 37 °C και ως παράγοντα αύξησης του ιζώδους, τη γλυκερόλη.

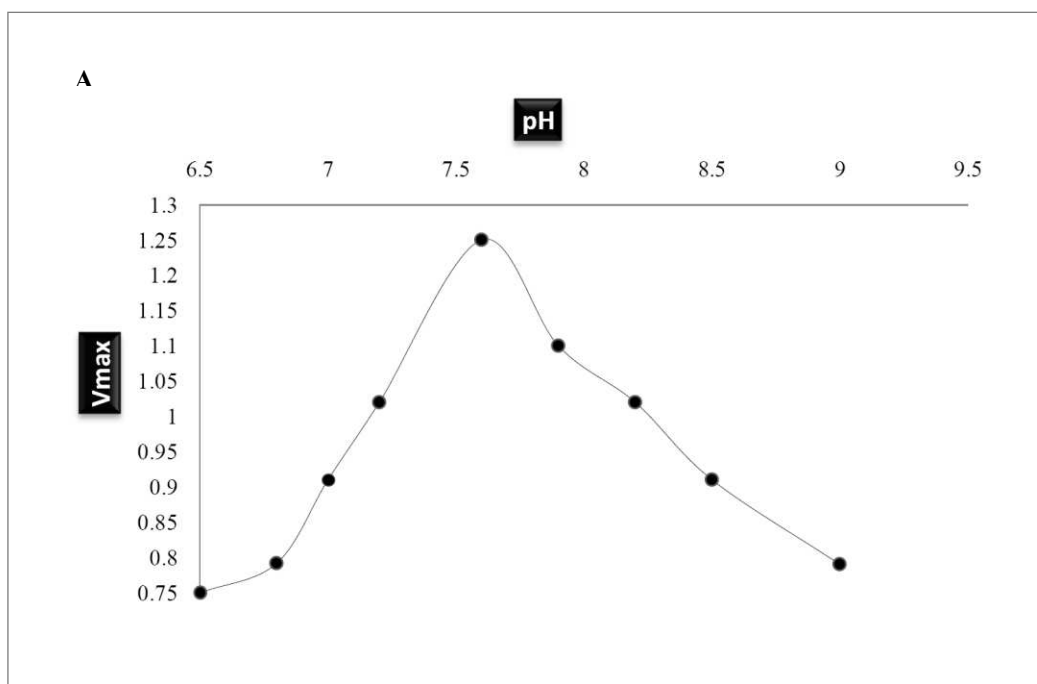
5.3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Τα ένζυμα όπως όλες οι πρωτεΐνες συμπεριφέροντε σαν πολυηλεκτρολύτες δηλαδή ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο βρίσκονται περιέχουν ομάδες τόσο με θετικά όσο και με αρνητικά φορτία. Η κατανομή, ωστόσο, των φορτιών στο μόριο του ενζύμου παρότι μεταβάλλεται συνεχώς με αντίστοιχες μεταβολές του pH του περιβάλλοντος, η καταλυτική δράση του ενζύμου διατηρείται ανεπηρέαστη σε μεγάλες περιοχές της κλίμακας του pH και επηρεάζεται δραματικά σε άλλες περιοχές. Το παραπάνω φαινόμενο εκφράζεται γραφικά με μια κωδωνοειδή καμπύλη η οποία παρουσιάζει την επίδραση του pH στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου.

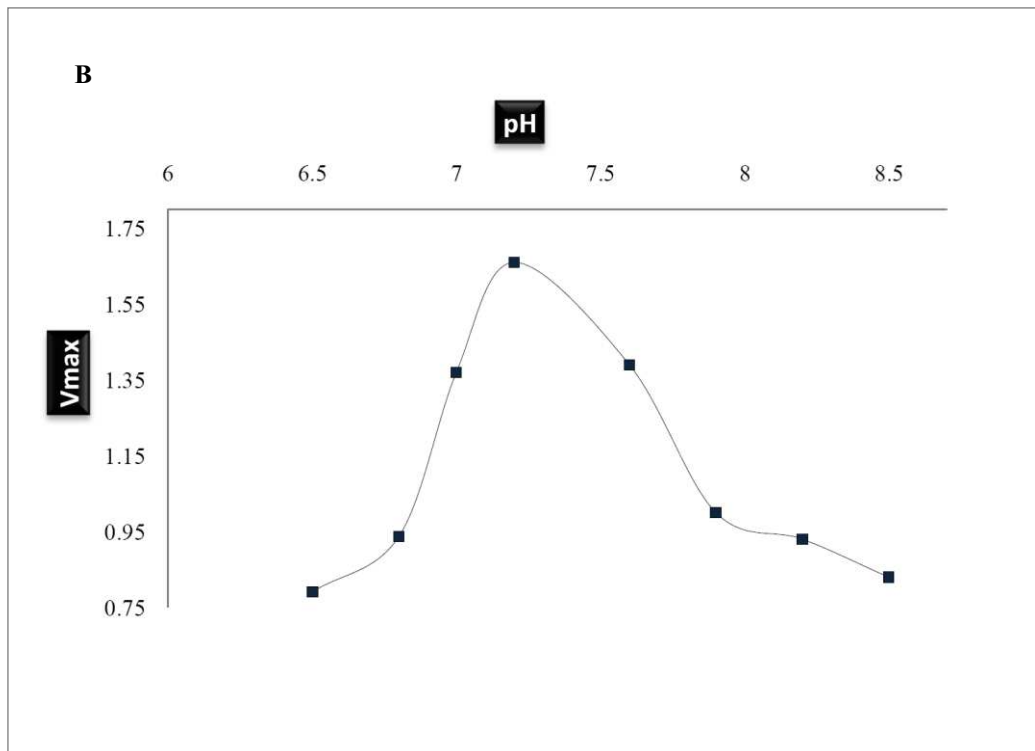
Το pH, βέβαια, δεν επηρεάζει τον ιονισμό μόνο του ενζύμου, αλλά και του υποστρώματος, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, των ενεργοποιητών ή και των αναστολέων. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πτώση στη δραστηριότητα του ενζύμου που παρατηρείται εκατέρωθεν μιας βέλτιστης τιμής και η οποία οφείλεται σε έναν η περισσότερους παράγοντες (Tipton & Dixon, 1979): σε πραγματική και αμφίδρομη επίδραση της συγκέντρωσης πρωτονίων, στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, σε ελάττωση της δυνατότητας δημιουργίας

του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος με αποτέλεσμα τον ατελή κορεσμό του ενζύμου από το υπόστρωμα και σε μεταβολή της διαμόρφωσης του ενζύμου, που μπορεί και να μην είναι αμφίδρομη, με αποτέλεσμα την καταστροφή της καταλυτικής ιδιότητας του μορίου. Είναι φανερό επομένως, ότι το pH έχει επιπτώσεις τόσο στη μέγιστη ταχύτητα V_{max} της ενζυμικής αντίδρασης όσο και στη σταθερά Michaelis K_m (Walsh, 1979).

Η επίδραση του pH στην κινητική παράμετρο V_{max} (παράγραφος 5.2.5) μελετήθηκε για το εύρος τιμών pH 6,5 έως 8,5 και προσδιορίστηκαν τα άριστα pH δράσης των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.8, το βέλτιστο pH δράσης του *GmGSTU2-2* βρίσκεται στην περιοχή του 7,5 και για το *GmGSTU10-10* παρατηρείται μια ελάχιστη (ή ασήμαντη) μετατόπιση της καμπύλης προς τα αριστερά δηλαδή στην περιοχή τιμών pH 7-7,5. Οι άριστες τιμές pH, επομένως και για τα δυο ένζυμα κυμαίνονται στη βέλτιστη περιοχή pH των ενζύμων GST η οποία βρίσκεται κοντά στο 7,5 (Arca et al., 1990).



ΣΧΗΜΑ 5.8.A. Εξάρτηση της κινητικής παραμέτρου V_{max} του ενζύμου *GmGSTU2-2* από το pH. Οι μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα GSH και CDNB.



ΣΧΗΜΑ 5.8.B. Εξάρτηση της κινητικής παραμέτρου V_{max} του ενζύμου *GmGSTU10-10* από το pH. Οι μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα υποστρώματα GSH και CDNB.

5.3.5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10*.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη των κινητικών ιδιοτήτων των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* και προσδιορίστηκαν οι κινητικές τους σταθερές K_m και k_{cat} . Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη των ενζύμων είναι τα CDNB, fluorodifen, CuOOH και t-BuOOH των οποίων οι δομές παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.6. Η ενζυμική δραστηριότητα των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* έναντι αυτών των υποστρωμάτων υπολογίστηκε με βάση τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς που περιγράφονται στις παραγράφους 2.4.19.1 για το CDNB, 2.4.19.10 για το fluorodifen και 2.4.19.2 για τα t-BuOOH και CuOOH.

Η κινητική ανάλυση για τη μελέτη της εξάρτησης της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* από τη συγκέντρωση του GSH πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M φωσφορικού καλίου, pH 6,5 που περιέχει 1 mM CDNB και GSH σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση με εύρος συγκεντρώσεων 37,5 έως 225 μ M. Η κινητική α-

νάλυση της εξάρτησης της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης των ενζύμων από τη συγκέντρωση του CDNB πραγματοποιήθηκε σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 6,5 που περιέχει 2,5 mM GSH και CDNB σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση (15-120 μM). Η επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SigmaPlot 11.0. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν τις τιμές των κινητικών σταθερών k_{cat} και K_m και παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.6 και 5.7 ενώ στα Σχήματα 5.9 (για το ζεύγος υποστρωμάτων GSH/CDNB), 5.10 (για το ζεύγος υποστρωμάτων GSH/CuOOH), 5.11 (για το ζεύγος υποστρωμάτων GSH/t-BuOOH) και 5.12 (για το ζεύγος υποστρωμάτων GSH/fluorodifen) παρουσιάζεται γραφικά η εξάρτηση της ενζυμικής ταχύτητας από τη συγκέντρωση των διάφορων υποστρωμάτων.

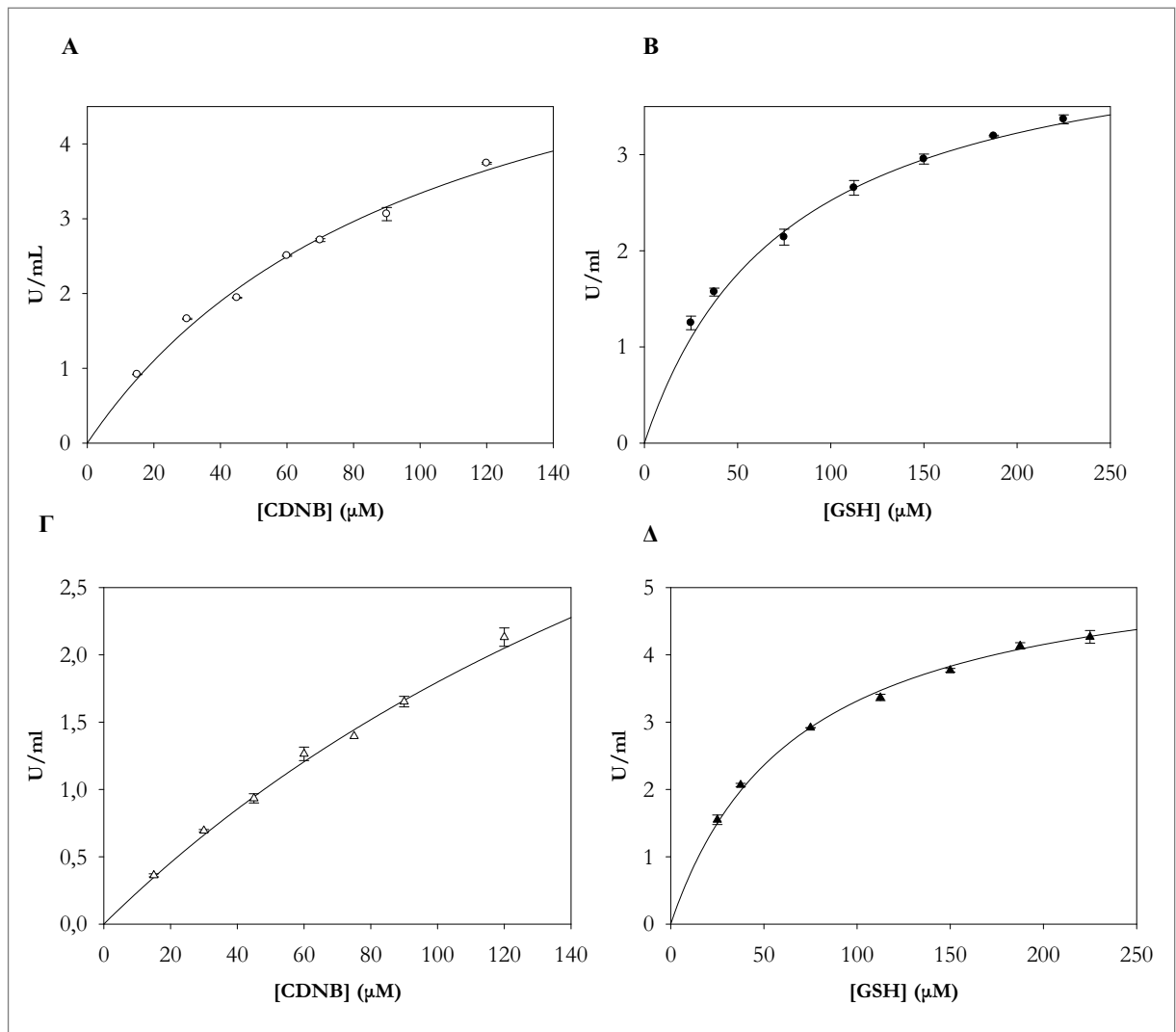
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κινητικής μελέτης των ενζύμων για το υπόστρωμα fluorodifen πραγματοποιήθηκε σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων του συγκεκριμένου υποστρώματος. Η καμπύλη εξάρτησης της ταχύτητας από τη συγκέντρωση του υποστρώματος t-BuOOH για το ένζυμο GmGSTU2-2, δεν υπακούει σε ορθογώνια υπερβολή τύπου Michaelis-Mentel όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο σχήμα. 5.11. (A). Όσον αφορά το υπόστρωμα CuOOH, η τιμή της σταθερές εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) εμφανίζεται να είναι μεγαλύτερη για το GmGSTU10-10 κατά 6-φορές περίπου συγκριτικά με το GmGSTU2-2. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το ένζυμο GmGSTU2-2 εμφανίζει γενικά χαμηλές τιμές σταθερών εξειδίκευσης ως προς τα υπεροξειδία που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη των ενζύμων. Το GmGSTU10-10 εμφανίζει σχεδόν τριπλάσια K_m για το t-BuOOH συγκριτικά με το έτερο υπεροξείδιο CuOOH. Όσον αφορά το CDNB, το ένζυμο GmGSTU2-2 εμφανίζει αξιοσημείωτα μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα καθώς παρουσιάζει αυξημένη K_m κατά 2,7-φορές για το συγκεκριμένο υπόστρωμα συγκριτικά με το GmGSTU10-10. Χρησιμοποιώντας τη GSH ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα και διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του CDNB, διαπιστώνεται ότι και τα δύο ένζυμα εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένες τιμές σταθερών εξειδίκευσης (1.965 και 2.051 για τα ένζυμα GmGSTU2-2 και GmGSTU10-10 αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις σταθερές εξειδίκευσης για το μεταβαλλόμενο υπόστρωμα CDNB (823 και 569 για τα ένζυμα GmGSTU2-2 και GmGSTU10-10 αντίστοιχα).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.6. Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών του ενζύμου *GmGSTU2-2* για τα υποστρώματα GSH, CDNB, CuOOH, *t*-BuOOH και fluorodifen.

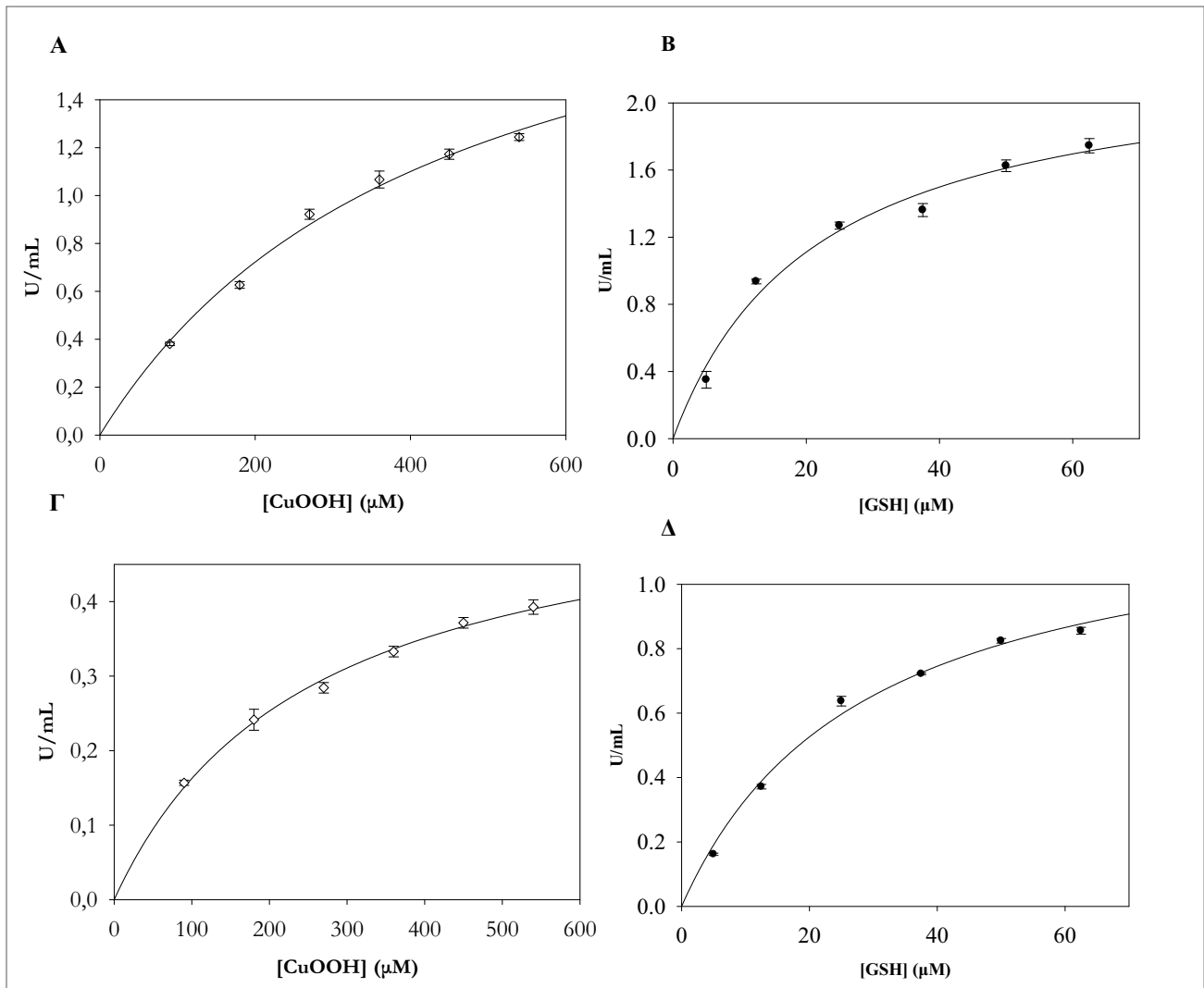
Υπόστρωμα	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ($\times 10^{-3}$)
<i>CDNB</i>			
GSH	151,46	77,08	1965
CDNB	85	103,29	823
<i>CuOOH</i>			
GSH	55,7	21,44	2.598
CuOOH	9,6	439,01	21,87
<i>t-BuOOH</i>			
GSH	1,58	61,46	25,73
<i>t</i> -BuOOH	85,66	27,28	3,14
<i>Fluorodifen</i>			
GSH	25,99	52,43	495,74
Fluorodifen	59,38	78,77	753,90

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.7. Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών του ενζύμου *GmGSTU10-10* για τα υποστρώματα GSH, CDNB, CuOOH, *t*-BuOOH και fluorodifen.

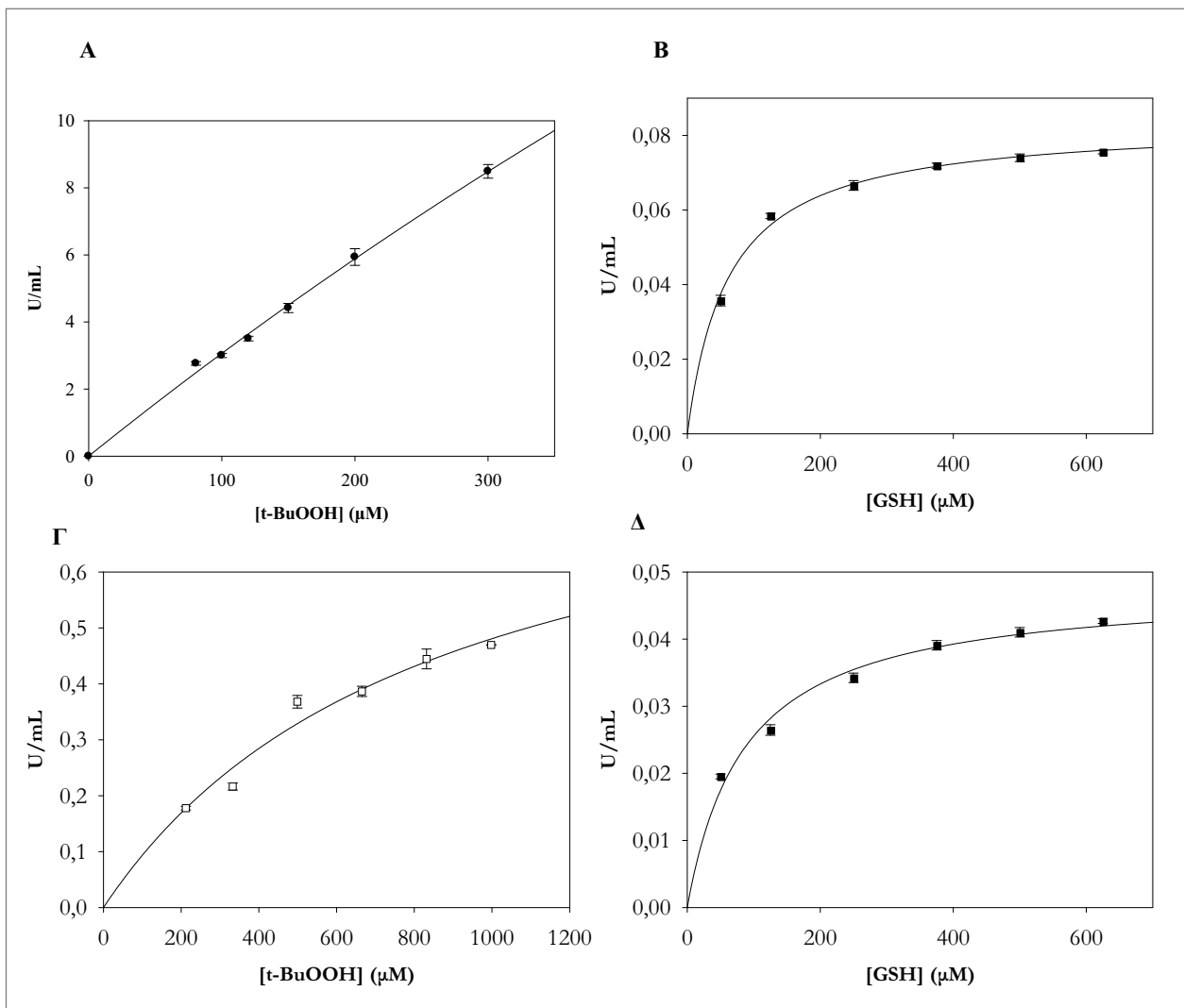
Υπόστρωμα	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ($\times 10^{-3}$)
<i>CDNB</i>			
GSH	139,22	67,86	2.051
CDNB	159,27	279,92	569
<i>CuOOH</i>			
GSH	31,5	28,57	1.102
CuOOH	35	251,83	139
<i>t-BuOOH</i>			
GSH	1,44	87,01	16,63
<i>t</i> -BuOOH	15,81	853,27	18,54
<i>Fluorodifen</i>			
GSH	23,11	64,75	356,99
Fluorodifen	49,13	66,16	742,65



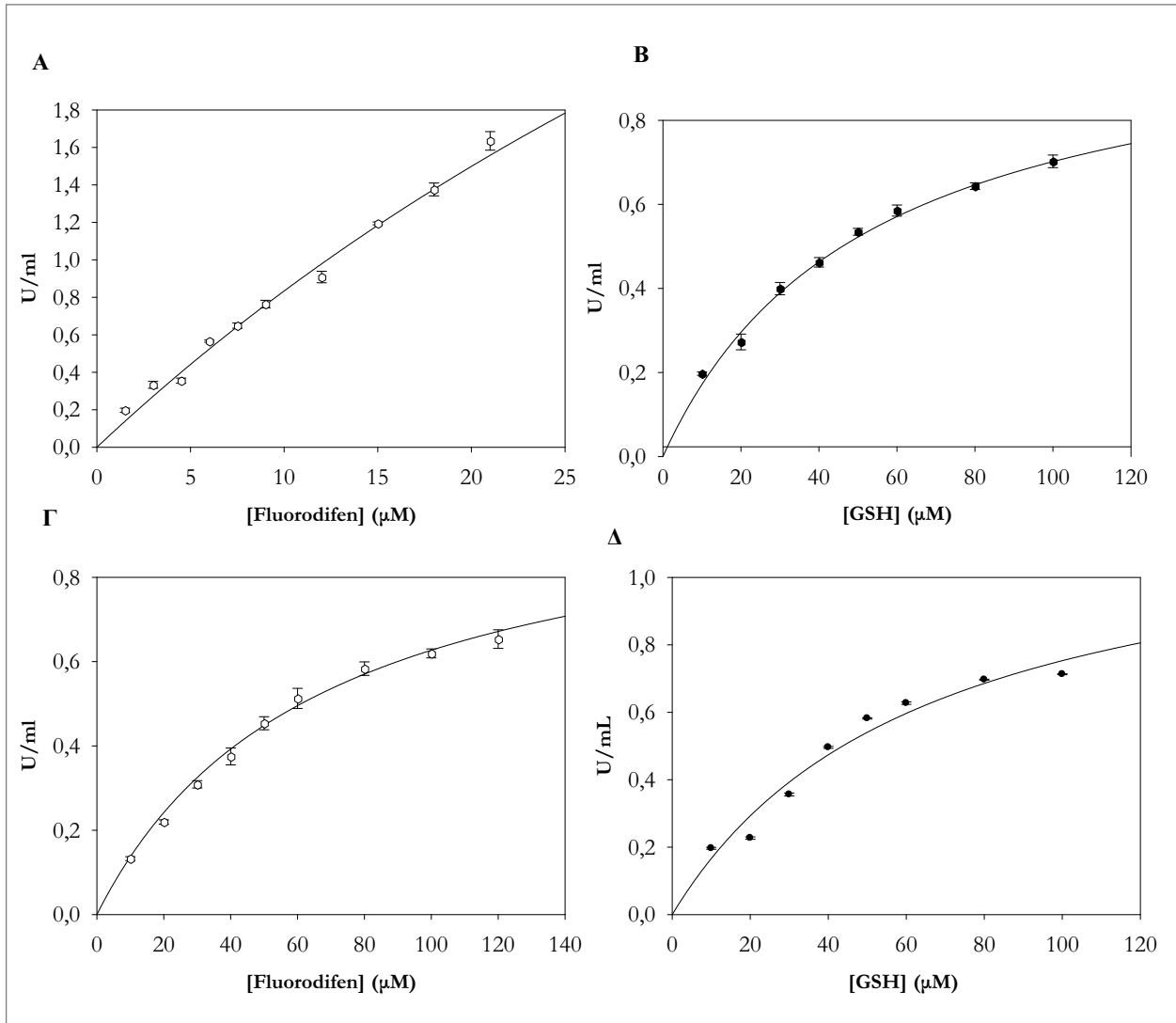
ΣΧΗΜΑ 5.9. **A.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (15-120 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (2,5 mM). **B.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (37,5-230 μM). Το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM). **Γ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (15-120 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (2,5 mM). **Δ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (37,5-230 μM). Το CDNB ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM).



ΣΧΗΜΑ 5.10. **A.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CuOOH (90-580 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM). **B.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (50-600 μM). Το CuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1,5 mM). **Γ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CuOOH (90-580 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM). **Δ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (50-600 μM). Το CuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1,5 mM).



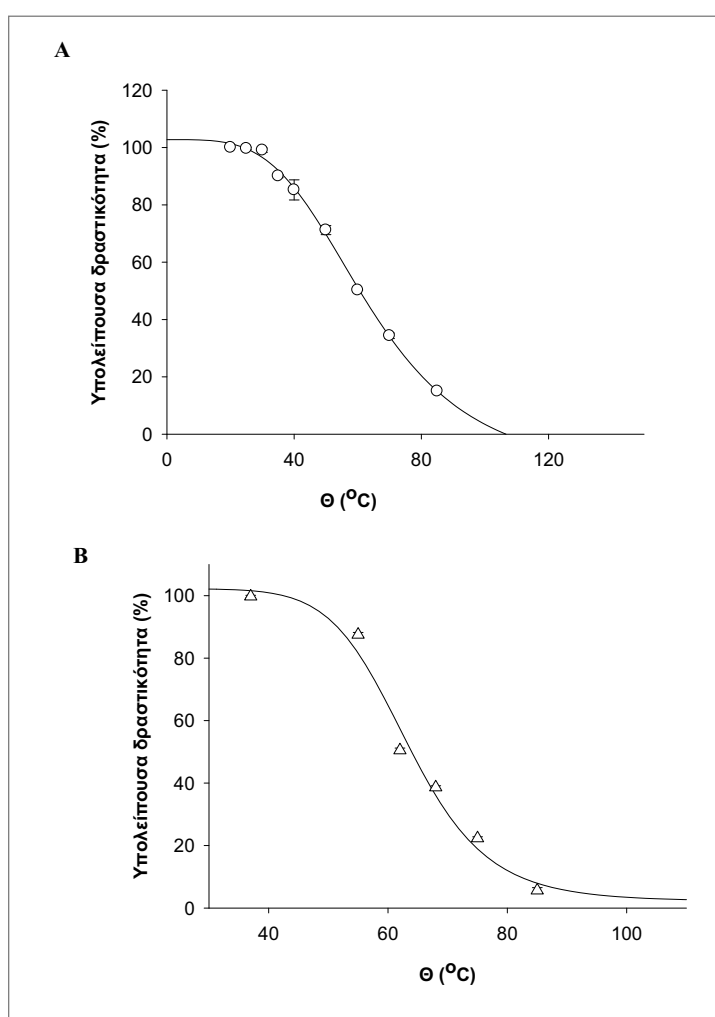
ΣΧΗΜΑ 5.11. **A.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το t-BuOOH (100-300 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM). **B.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU2-2*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (50-600 μM). Το t-BuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1,5 mM). **Γ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το t-BuOOH (200-1000 μM). Το GSH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1 mM). **Δ.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου *GmGSTU10-10*, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (50-600 μM). Το t-BuOOH ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (1,5 mM).



ΣΧΗΜΑ 5.12. Α. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου GmGSTU2-2 με το fluorodifen ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα (2-22 μM) και το GSH σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (5 mM) Β. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης για το GmGSTU2-2, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (10-100 μM). Το fluorodifen ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (0,05 mM). Γ. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου GmGSTU10-10 με το fluorodifen ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα (10-120 μM) και το GSH σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (5 mM) Δ. Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης για το GmGSTU10-10, χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το GSH (10-100 μM). Το fluorodifen ήταν σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού (0,05 mM).

5.3.6. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10*.

Η θερμική σταθερότητα των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* μελετήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.4. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 37-85°C σε pH 7, και παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.13. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SigmaPlot και οι τιμές T_m που προέκυψαν είναι $60,95 \pm 1,03$ °C και $62,43 \pm 0,62$ °C για τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* αντίστοιχα.



ΣΧΗΜΑ 5.13. Η καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης του ενζύμου *GmGSTU2-2* (A) και του ενζύμου *GmGSTU10-10* (B) σε pH 7. Οι υπολείπουσες δραστηριότητες προσδιορίστηκαν ύστερα από επάωση των ενζύμων για 5 min σε κάθε θερμοκρασία. Τα σφάλματα των πειραματικών σημείων ήταν <5 %.

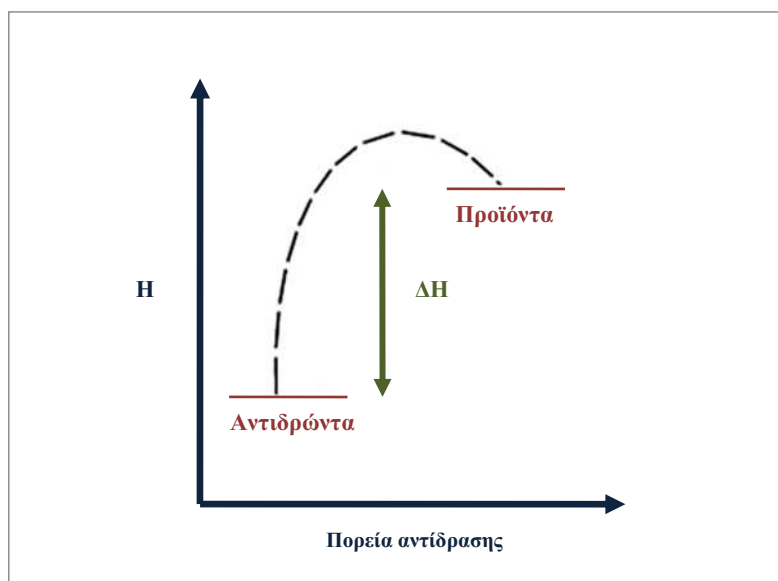
5.3.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.

Μελετήθηκε η εξάρτηση της καταλυτικής δραστηρότητας του ενζύμου από τη θερμοκρασία. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά k_{cat} για το υπόστρωμα CDNB μελετήθηκε για την περιοχή 0-50 °C. Πάνω από τη θερμοκρασία αυτή η δραστηρότητα μειώνεται λόγω θερμικής μετουσίωσης της πρωτεΐνης.

Εφαρμόζοντας την εξίσωση του Arrhenius (εξίσωση 4.1, παράγραφος 4.3.6), προσδιορίζονται οι τιμές V_{max} και παρουσιάζεται γραφικά (Σχήμα 5.15) η ανάλυση της επίδρασης της θερμοκρασίας στη δραστηρότητα των ενζύμων GmGSTU2-2 και GmGSTU10-10 (γραφική παράσταση $\ln V_{max}$ έναντι $1/T$).

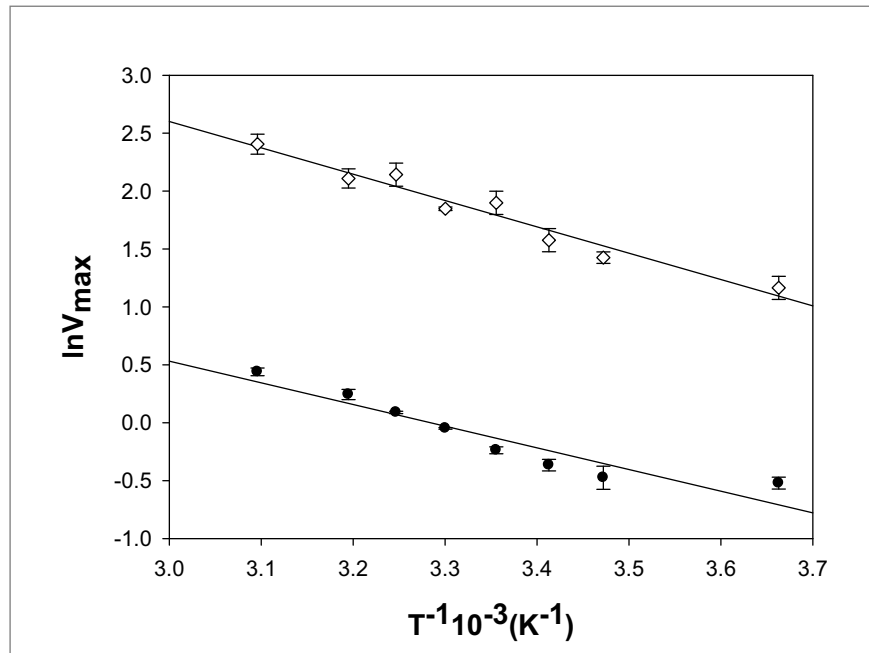
Οι μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας των ενζυμικών αντιδράσεων υπολογίστηκαν με την εξίσωση του Eyring (εξίσωση 4.6, παράγραφος 4.3.6). Τα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζονται στη γραφική παράσταση του μεγέθους $\ln(k_{cat}/T)$ έναντι του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας ($1/T$) (Σχήμα 5.16). Η ανάλυση, κατόπιν, των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια της εξίσωσης του Eyring, οδήγησε στον προσδιορισμό των μεταβολών της ενθαλπίας και της εντροπίας των καταλυτικών αντιδράσεων.

Στον Πίνακα 5.8, παρουσιάζονται οι τιμές της μεταβολής της ενθαλπίας, της ενέργειας ενεργοποίησης και της μεταβολής της εντροπίας για τα ένζυμα GmGSTU2-2 και GmGSTU10-10. Η ΔH^\ddagger είναι η διαφορά της ενθαλπίας μεταξύ της μεταβατικής κατάστασης της αντίδρασης και της θεμελιώδους κατάστασης των αντιδρώντων. Παρατηρούμε πως η ΔH^\ddagger παρουσιάζεται θετική, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αντιδρώντα βρίσκονται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο από τα προϊόντα (Σχήμα 5.14). Το φαινόμενο αυτό είναι απόρροια της λύσης των δεσμών των αντιδρώντων κατά τη μεταβατική κατάσταση (Laidler, 1997).

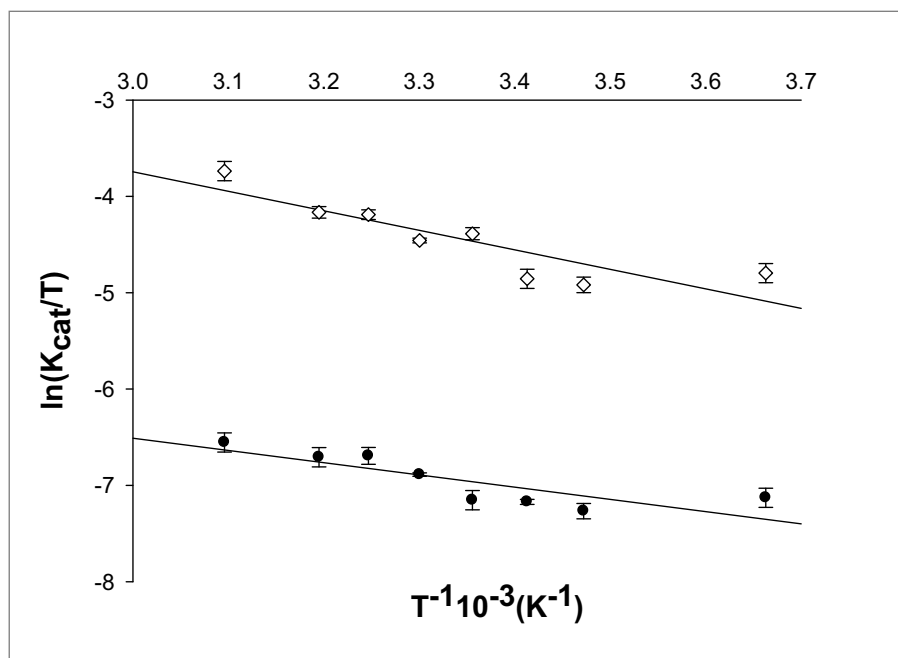


ΣΧΗΜΑ 5.14. Η διαφορά ενθαλπίας (ΔH) έχει θετικό πρόσημο όταν ενθαλπία (H) των αντιδρώντων είναι μικρότερη από την ενθαλπία των προϊόντων.

Η ΔS^\ddagger δηλώνει την αταξία του συστήματος. Κατά τον Boltzmann η εντροπία σχετίζεται με τον αριθμό των διαφορετικών μικροσκοπικών τρόπων με τους οποίους διατάσσονται τα αντιδρώντα μόρια κατά τη μεταβατική κατάσταση προκειμένου να σχηματιστεί το ενεργοποιημένο σταθερό σύμπλοκο (Laidler, 1997). Οι τιμές της ΔS^\ddagger παρουσίασαν αρνητικό πρόσημο. Η αρνητική εντροπία είναι τόσο μεγαλύτερη όσο πιο οργανωμένη είναι η διάταξη των αντιδρώντων μορίων. Η ενέργεια ενεργοποίησης E_a αναφέρεται στην ελάχιστη ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση και για τις περισσότερες αντιδράσεις κατάλυσης οι τιμές της E_a κυμαίνονται από 2 έως 40 Kcal mol⁻¹. Για το ένζυμο *GmGSTU2-2* η τιμή της E_a είναι μικρότερη κατά 1,5 φορές περίπου συγκριτικά με τη τιμή της E_a για το ένζυμο *GmGSTU10-10*. Γενικά μικρότερες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης υποδηλώνουν ότι η αντίδραση πραγματοποιείται ευκολότερα (Γιαννακουδάκης, 1993). Η σχέση αυτή μπορεί να γίνει κατανοητή με βάση τον παρακάτω συλλογισμό: τα αντιδρώντα σε μια χημική αντίδραση έχουν ενέργεια, την οποία όταν έρθουν σε επαφή μπορούν να χρησιμοποιήσουν για να υπερκαλύψουν το απαιτούμενο ποσό της ενέργειας ενεργοποίησης, και έτσι, μέσω της μεταβατικής κατάστασης να μετατραπούν σε προϊόντα. Είναι προφανές ότι όλα τα αντιδρώντα μόρια δεν έχουν την ίδια ενέργεια. Άρα, όσο μικρότερο είναι το ενεργειακό «εμπόδιο» της ενέργειας ενεργοποίησης, τόσο αυξάνεται ο αριθμός των μορίων που μπορούν να το υπερπηδήσουν και τόσο ταχύτερη είναι η χημική αντίδραση. Όταν η ενέργεια ενεργοποίησης έχει μεγάλη τιμή, τότε μικρός μόνο αριθμός μορίων μπορεί να την υπερπηδήσει, εκτός και αν δοθεί στην αντίδραση ενέργεια από το περιβάλλον, συνήθως με τη μορφή θερμότητας.



ΣΧΗΜΑ 5.15. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα των ενζύμων *GmGSTU2-2* (●) και *GmGSTU10-10* (◇). Τα δεδομένα της δραστηριότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση του Arrhenius (εξίσωση 4.6).



ΣΧΗΜΑ 5.16. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα των ενζύμων *GmGSTU2-2* (◇) και *GmGSTU10-10* (●). Τα δεδομένα της δραστηριότητας αναλύθηκαν με την εξίσωση του Eyring (εξίσωση 4.6).

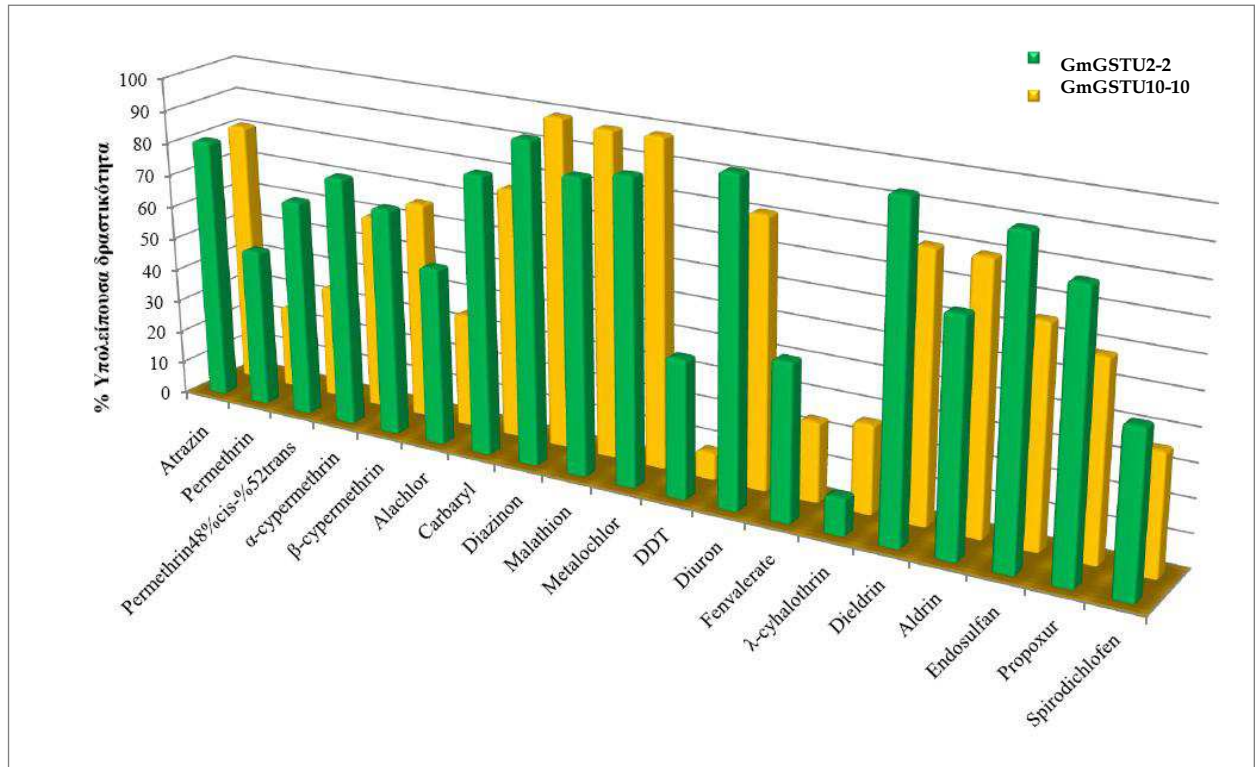
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.8. Οι τιμές των E_a , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τις εξισώσεις του Arrhenius (εξίσωση 4.1) και του Eyring (εξίσωση 4.6).

Ένζυμο	E_a (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (kJ/mol·K)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)
<i>GmGSTU2-2</i>	14,88	-0,18	16,67
<i>GmGSTU10-10</i>	19,14	-0,17	12,42

5.3.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10* ΑΠΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.

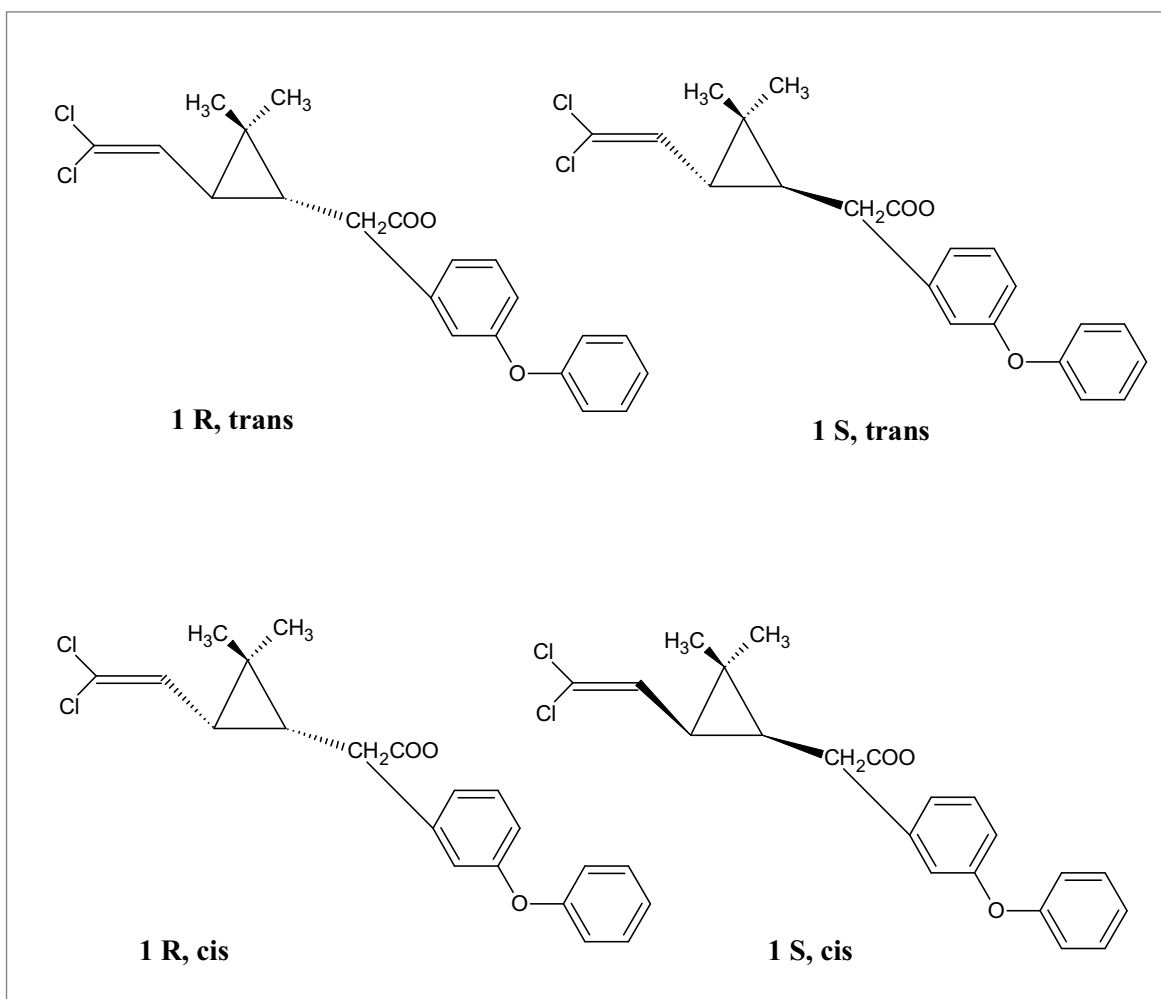
Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ξενοβιοτικών ενώσεων (ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων) στην αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας των *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Αρχικά, πραγματοποιείται μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών με υπόστρωμα το CDNB (παράγραφος 2.4.19.1) για να ελεγχθεί η δραστηριότητα τους, απουσία ξενοβιοτικών ενώσεων. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα % των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* υπό την επίδραση μιας σειράς ξενοβιοτικών ενώσεων (τελική συγκέντρωση ξενοβιοτικού 0,1 mM) (παράγραφος 5.2.8). Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά σε ένα διάγραμμα (Σχήμα 5.17) και για τα δυο ένζυμα, έτσι ώστε να εξαχθούν συγκριτικά συμπεράσματα. Η χημική δομή των ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και σχετικές πληροφορίες παρέχονται στο Παράρτημα.

Παρατηρούμε μεγάλη ελάττωση της ενζυμικής δραστηριότητας υπό τη επίδραση των περισσότερων πυρεθροειδών που εξετάστηκαν. Αξίζει να τονισθούν τα εντυπωσιακά ποσοστά αναστολής που παρατηρούνται από το πυρεθροειδές εντομοκτόνο λ cyhalothrin (μείωση κατά 88,9% για το *GmGSTU2-2* και κατά 73,4% για το *GmGSTU10-10*), τα οποία αποτελούν και τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας της *GmGSTU2-2* στο σύνολο των ενώσεων που εξεταστήκαν ως πιθανοί αναστολείς.



ΣΧΗΜΑ 5.17. Απεικόνιση της υπολείπουσας δραστηριότητας (%) των ενζύμων *GmGSTU2-2* (πράσινο χρώμα) και *GmGSTU10-10* (κίτρινο χρώμα) υπό την επίδραση διάφορων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων.

Παραμένοντας στην κατηγορία των πυρεθροειδών, το εντομοκτόνο permethrin (τεχνικό παρασκεύασμα cis:trans 60:40) εξετάστηκε επίσης ως πιθανός αναστολέας των ενζύμων όπως και ένα μίγμα ισομερών της ένωσης αποτελούμενο από cis:trans 48:52. Το συγκεκριμένο εντομοκτόνο απαντάται σε τέσσερα στερεοϊσομερή (Σχήμα 5.18). Το ισομερές 1R, cis είναι το πιο δραστικό ανάμεσα στα ισομερή και γι' αυτό το λόγο και το πιο τοξικό και ακολουθείται σε βαθμό τοξικότητας από το 1R,trans ισομερές. (Zhang et al., 2008). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της cis μορφής της ένωσης σε ένα μίγμα cis trans ισομερών τόσο περισσότερο τοξική είναι η ένωση (Dornetshuber et al, 2007, Wallwork et al 1974). Τα πειράματα που διεξήχθησαν για τη μελέτη της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας των ενζύμων έδειξαν ότι το μίγμα ισομερών cis:trans 48:52 εμφάνισε μειωμένη αναστολή σε σχέση με το μίγμα cis:trans 60:40 και για τα δυο ένζυμα (μείωση κατά 51,39 για το permethrin και 33,34 για το μίγμα ισομερών). Όσον αφορά το *GmGSTU2-2* και αντιστοίχως 74,67% και 65,34% για το *GmGSTU10-10*. Συμπερασματικά, μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε για το πιο τοξικό μίγμα cis trans ισομερών.



ΣΧΗΜΑ 5.18. Οι τέσσερις στερεοϊσομερείς μορφές του εντομοκτόνου permethrin.

Στην κατηγορία των πυρεθροϊκών εντομοκτόνων αυξημένη αναστολή παρατηρήθηκε και για το fenvalerate ενώ τα α -cypermethrin και β -cypermethrin παρουσίασαν παρόμοια ποσοστά αναστολής της ενζυμικής δράσης.

Όσον αφορά την κατηγορία των οργανοχλωρικών εντομοκτόνων και τον κύριο εκπρόσωπο τους, το DDT, ο προσδιορισμός της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου *GmGSTU2-2* δείχνει τη σημαντική επίδραση της συγκεκριμένης ιδιαίτερα σταθερής ένωσης στην αναστολή της δράσης του ενζύμου. Ακόμη πιο εντυπωσιακή είναι η υπολείπουσα δραστηριότητα του *GmGSTU10-10* υπό την επίδραση του DDT καθώς εμφανίζει υπολείπουσα δραστηριότητα συγκριτικά με το *GmGSTU2-2* υψηλότερη κατά 5-φορές (41,66% για το *GmGSTU2-2* σε σχέση με 8% για το *GmGSTU10-10*). Από το σύνολο των ζιζανιοκτόνων, μόνο το alachlor φαίνεται να αναστέλλει αποτελεσματικά τη δράση των δύο ενζύμων και ιδιαίτερα του *GmGSTU10-10*. Τα εντομοκτόνα σε γενικές γραμμές φαίνεται να αυξάνουν τα

ποσοστά αναστολής των ενζύμων σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με το σύνολο των ζιζανιοκτόνων.

5.3.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IC_{50} ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ *GmGSTU2-2* ΚΑΙ *GmGSTU10-10* ΑΠΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.

Μελετήθηκε περαιτέρω η αναστολή της δραστηριότητας των ενζύμων από τις ξενοβιοτικές ενώσεις alachlor, λ-cyhalothrin, fenvalerate, permethrin, DDT και spirodichlofen. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παράγραφο 5.3.8 τα συγκεκριμένα ξενοβιοτικά φαίνεται να εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής της δραστηριότητας για τις πρωτεΐνες *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν ώστε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα τους και να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} των συγκεκριμένων αναστολέων (Πίνακας 5.9). Η τιμή IC_{50} (inhibition concentration) είναι η τιμή της συγκέντρωσης του ξενοβιοτικού, που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των τιμών IC_{50} (Cheng & Prusoff, 1973) είναι η ακόλουθη:

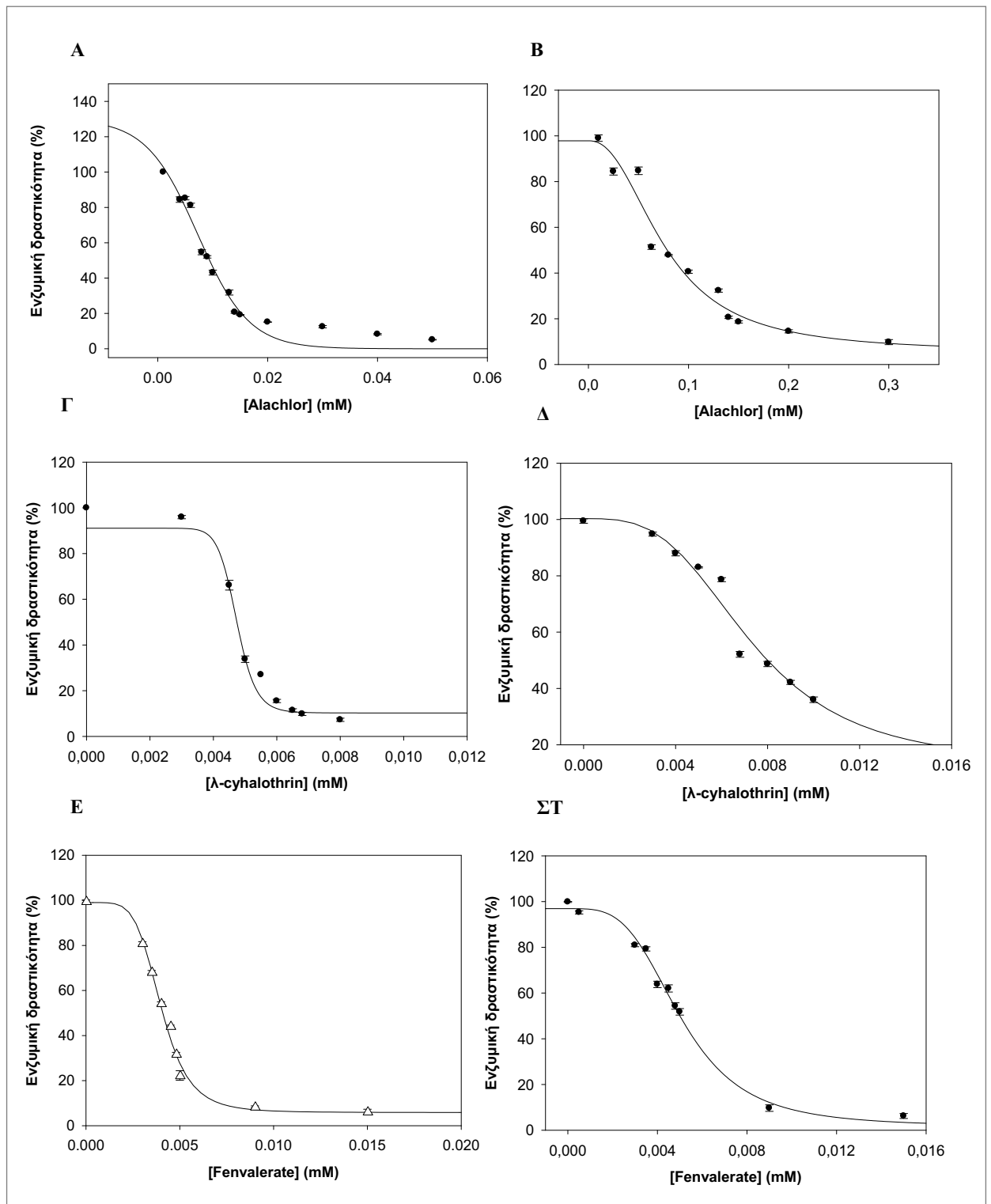
$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{100}{1 + (IC_{50}/[I])} \quad (5.9)$$

όπου [I] η συγκέντρωση του παρεμποδιστή. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.9 και τα αποτελέσματα δίνονται στα Σχήματα 5.19 (για τις ενώσεις alachlor, λ-cyhalothrin, fenvalerate) και 5.20 (για τις ενώσεις permethrin, DDT και spirodichlofen). Οι τιμές IC_{50} για τις ξενοβιοτικές ενώσεις που μελετήθηκαν προσδιορίστηκαν από την εξίσωση και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.9.

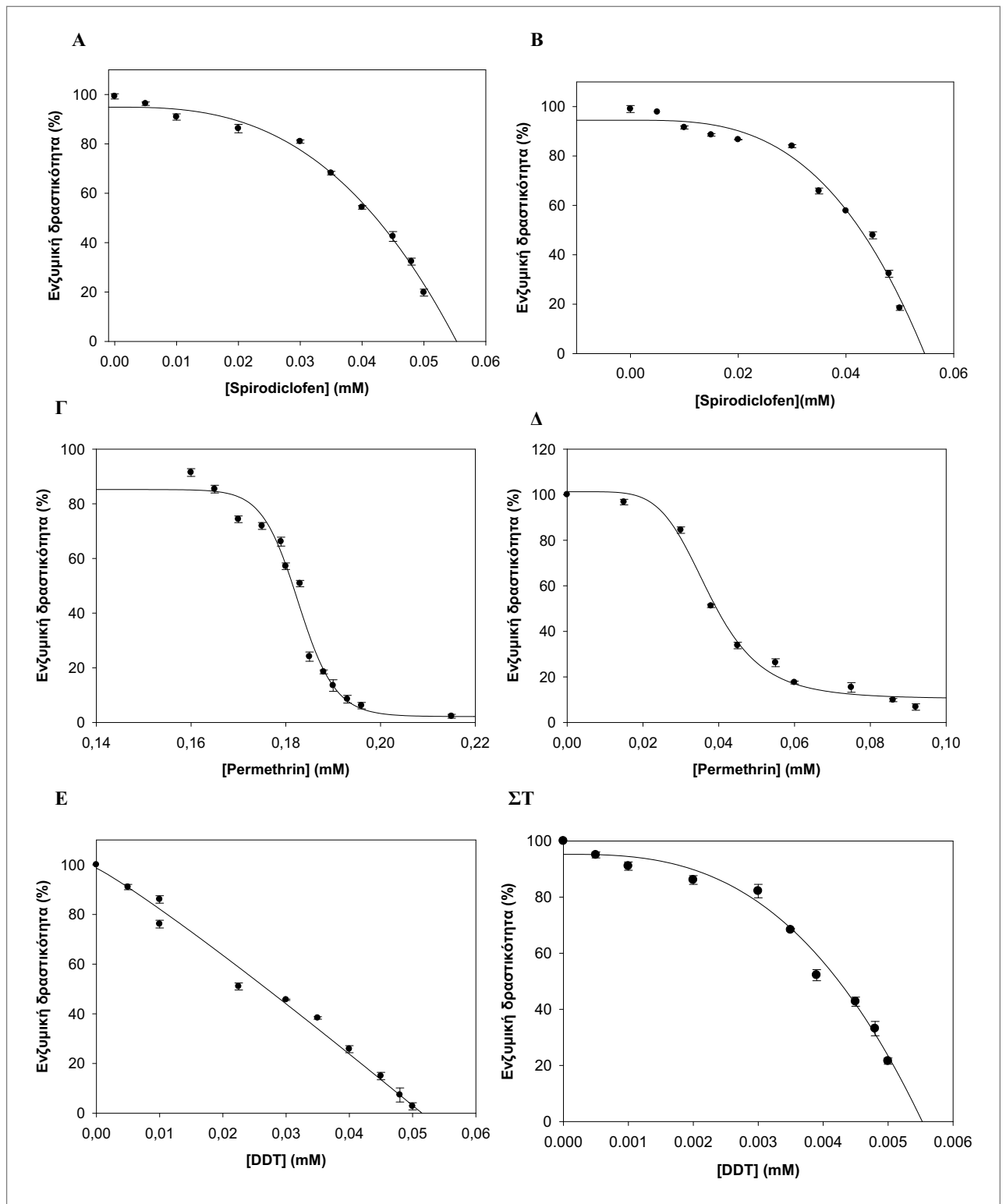
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.9. Οι τιμές IC_{50} των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* υπό την επίδραση των ξενοβιοτικών ενώσεων alachlor, λ-cyhalothrin, fenvalerate, permethrin, spirodichlofen και DDT.

Ένζυμο	Ξενοβιοτικές ενώσεις	IC_{50} (mM)
<i>GmGSTU2-2</i> <i>GmGSTU10-10</i>	Alachlor	0,01 ± 0,38 0,086 ± 0,48
<i>GmGSTU2-2</i> <i>GmGSTU10-10</i>	λ-cyhalothrin	0,0048 ± 0,01 0,0079 ± 0,03
<i>GmGSTU2-2</i> <i>GmGSTU10-10</i>	Fenvalerate	0,0048 ± 0,01 0,0051 ± 9x10 ⁻⁵

<i>GmGSTU2-2</i>	Spirodichlofen	0,0412 ± 0,39
<i>GmGSTU10-10</i>		0,0431 ± 0,23
<i>GmGSTU2-2</i>	Permethrin	0,18 ± 0,64
<i>GmGSTU10-10</i>		0,038 ± 0,12
<i>GmGSTU2-2</i>	DDT	0,0285 ± 0,02
<i>GmGSTU10-10</i>		0,0043 ± 0,003



ΣΧΗΜΑ 5.19. Επίδραση των ξενοβιοτικών alachlor (Α), λ-cyhalothrin (Γ), fenvalerate (Ε) στη δραστηριότητα του ενζύμου GmGSTU2-2. Επίδραση των ξενοβιοτικών alachlor (Β), λ-cyhalothrin (Δ), fenvalerate (ΣΤ) στη δραστηριότητα του ενζύμου GmGSTU10-10.



ΣΧΗΜΑ 5.20. Επίδραση των ξενοβιοτικών spirodichlofen (A), permethrin (Γ) και DDT (E) στη δραστηκότητα του ενζύμου GmGSTU2-2. Επίδραση των ξενοβιοτικών spirodichlofen (B), permethrin (Δ) και DDT (ΣΤ) στη δραστηκότητα του ενζύμου GmGSTU10-10.

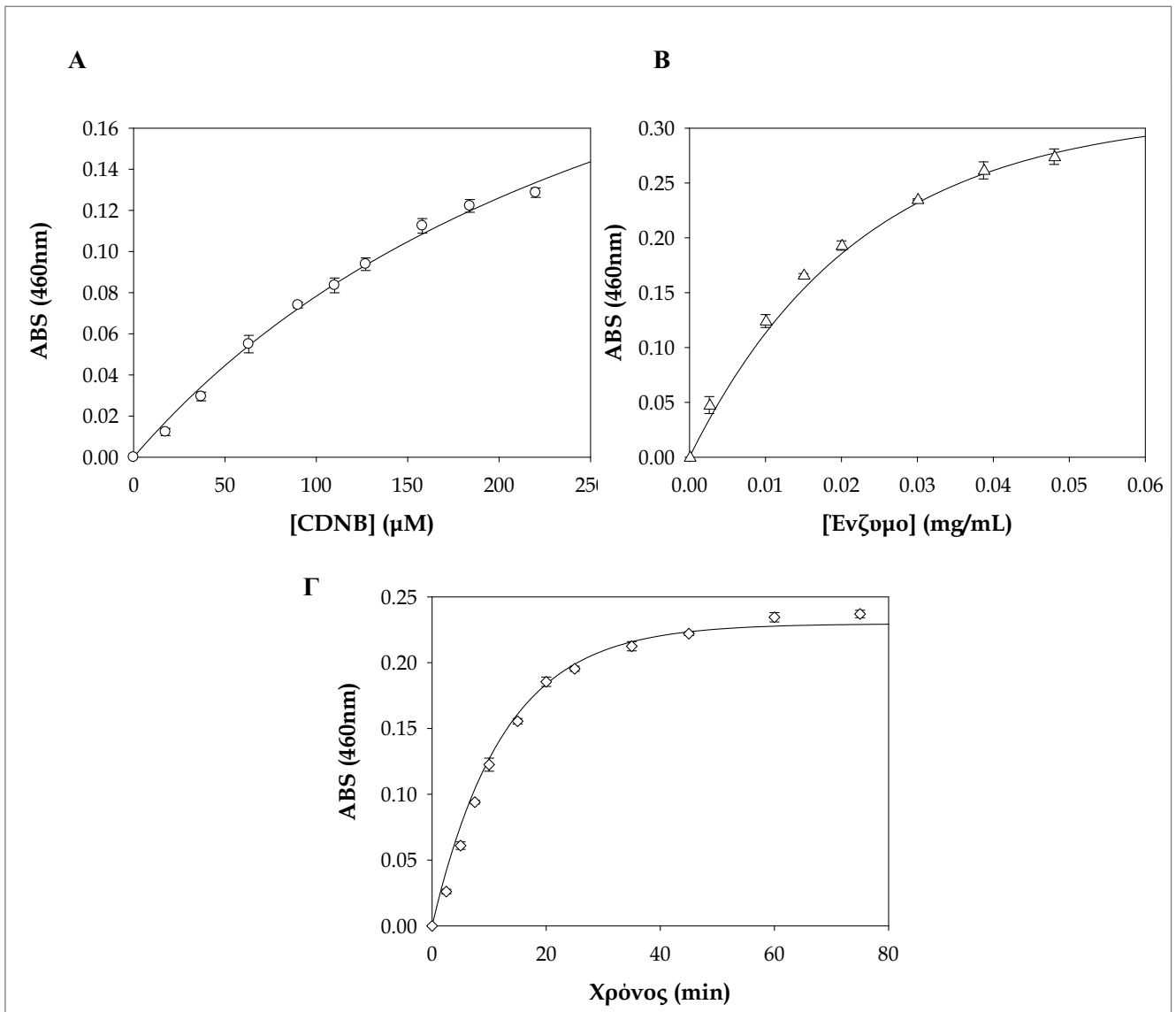
5.3.10. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ GSTs ΕΝΑΝΤΙ ΑΛΟΓΟΝΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.

Η ποσοτική μέθοδος προσδιορισμού GSTs που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.19.10 και βασίζεται στον φωτομετρικό υπολογισμό της συγκέντρωσης ιόντων αλογόνων που απελευθερώνονται από τα αλογονουποκατεστημένα υποστρώματα των GSTs, χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ταχεία σάρωση και ανίχνευση GSTs. Η συγκεκριμένη μέθοδος σάρωσης αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική και χρήσιμη πειραματική τεχνική καθώς παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης GSTs ικανές να καταλύουν αντιδράσεις με αλογονωμένες ενώσεις, μια κατηγορία ενώσεων που αποτελούν ιδιαίτερα τοξικούς ρύπους για το περιβάλλον και ειδικότερα για τα φυτά και τα ζώα.

5.3.10.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *GmGSTU4-4* ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ (ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ, ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ, ΧΡΟΝΟΣ) ΤΟΥ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ.

Με σκοπό να αναλυθεί η κινητική συμπεριφορά του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο το ένζυμο *GmGSTU4-4* (Axarli et al., 2008). Το ένζυμο αυτό ανήκει στην τ τάξη, έχει κλωνοποιηθεί από σόγια (*Glycine max*) και διαθέτει >90% ομολογία με τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος CDNB καθώς και της πρωτεΐνης στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Αυτό επιτεύχθηκε συσχετίζοντας τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται με την συγκέντρωση των αντίστοιχων υδραλογόνων που παράγονται ως προϊόντα της αντίδρασης απαλογόνωσης με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης (παράγραφος 2.4.19.10).

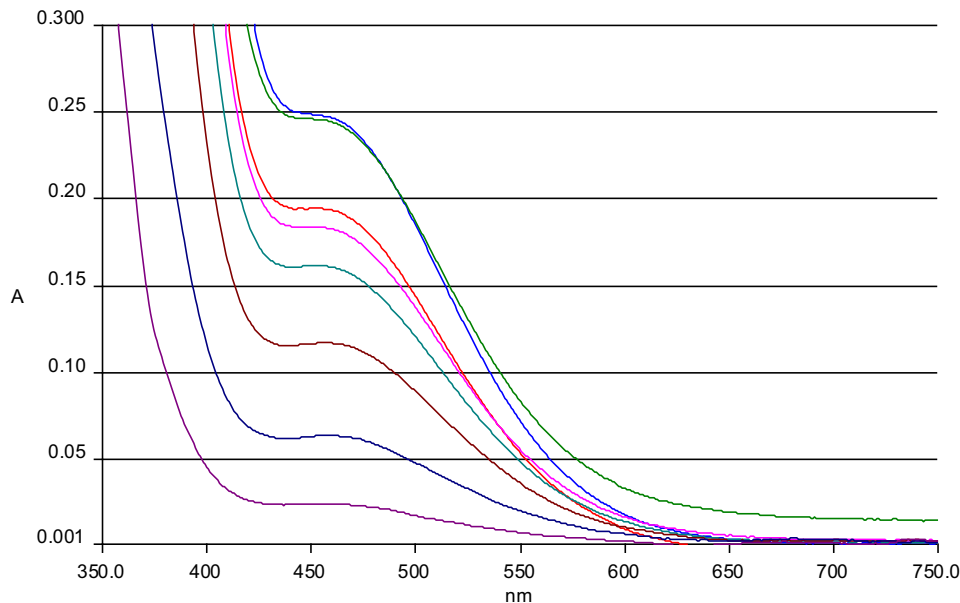
Οι γραφικές παραστάσεις που προκύπτουν δείχνουν τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούν στη συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου που απελευθερώνονται από το CDNB συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (0-220 μ M) (Σχήμα 5.21 Α), του ενζύμου (0-0,042mg/mL) (Σχήμα 5.21 Β) και του χρόνου αντίδρασης (Σχήμα 5.21 Γ). Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε φωτομετρικά η αλλαγή χρώματος λόγω της απελευθέρωσης αλογονοϊόντων στα 460nm ανά διαφορετικά χρονικά διαστήματα από 0 έως 75 λεπτά και παρήχθη η καμπύλη της οπτικής απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο (Σχήμα 5.21 Γ). Το CDNB βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση κορεσμού 1mM και το ένζυμο σε σταθερή συγκέντρωση 0,01mg/mL. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα SigmaPlot.



ΣΧΗΜΑ 5.21. Εξάρτηση της ταχύτητας απελευθέρωσης των ιόντων αλογόνου κατά την καταλυτική αντίδραση απαλογόνωσης με το CDNB από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (A) και από τη συγκέντρωση του ενζύμου (B), (Γ): καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου ως προς το υπόστρωμα CDNB.

Η χρωματική αλλαγή κατά την αντίδραση απαλογόνωσης για διαφορετικές ποσότητες ενζύμου (2-40 μg) απεικονίζεται στο φάσμα απορροφήσεων που παρουσιάζεται στην σχήμα 5.22. Τα ενζυμικά δείγματα μελετηθήκαν σε ένα εύρος φάσματος από 320nm έως 750nm. Όπως φαίνεται στο φάσμα απορροφήσεων, παρατηρείται μια κορυφή στα 340 nm λόγω της σύζευξης του CDNB με τη γλουταθειόνη. Παράλληλα η κορυφή που εμφανίζεται στα 460 nm οφείλεται στην απορρόφηση κατά τον σχηματισμό του πορτοκαλί χρώματος από την αντίδρα-

ση των αλογονοϊόντων με τον θειοκυανιούχο υδράργυρο και τα ιόντα σιδήρου στο διάλυμα του νιτρικού οξέος. Στο σχήμα φαίνεται καθαρά ότι η κορυφή στα 460nm γίνεται πιο έντονη όσο αυξάνεται η ποσότητα του ενζύμου που προστίθεται.



ΣΧΗΜΑ 5.22. Φάσμα απορροφήσεων για την αντίδραση απαλογόνωσης του υποστρώματος CDNB από 320nm έως 750nm για διαφορετικές ποσότητες ενζύμου (2-40 μg). Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στην απορρόφηση που παρουσιάζει το διάλυμα με τη μέγιστη ποσότητα ενζύμου (40 μl) ενώ η μωβ γραμμή σε αυτή με την ελάχιστη ποσότητα ενζύμου (2 μg).

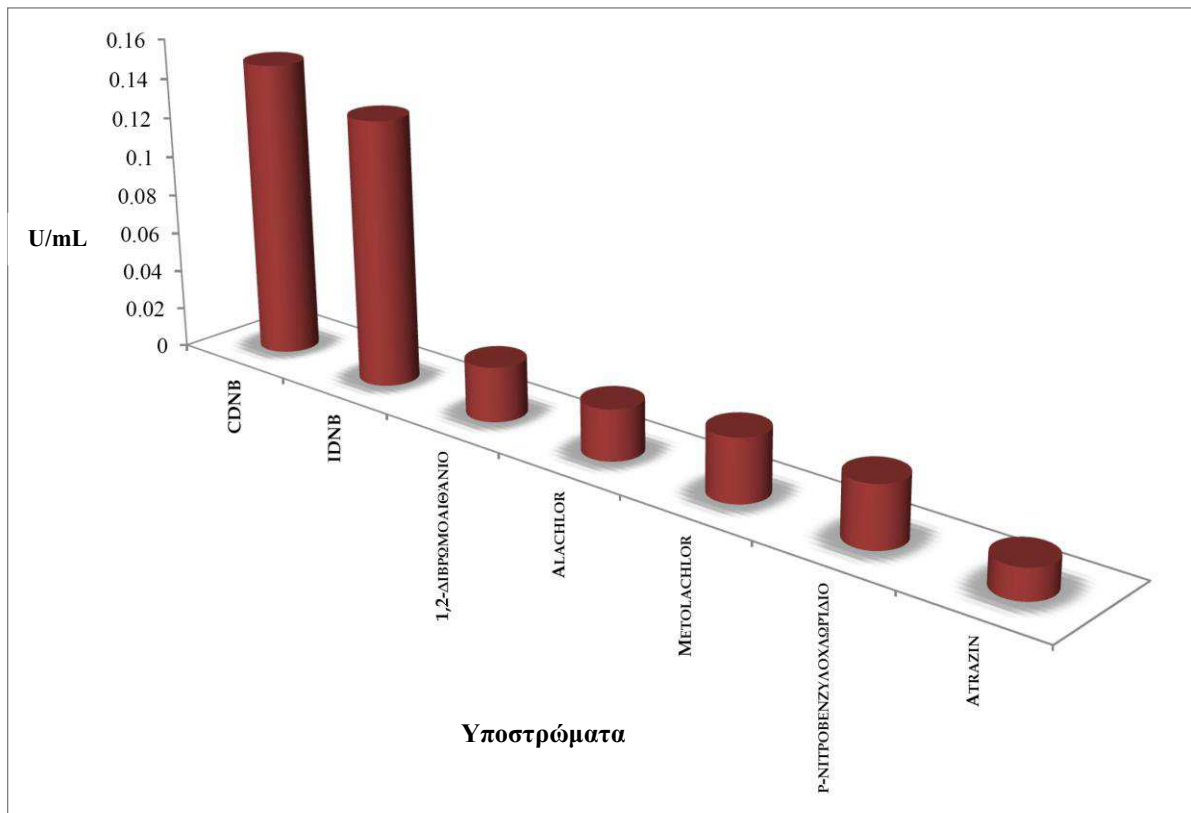
5.3.10.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΟΓΟΝΩΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ.

Μελετήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου *GmGSTU4-4* καθώς και η αναστολή της δραστηριότητάς του έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων και πιθανών αναστολέων αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τον φωτομετρικό προσδιορισμό με πλάκες μικροτιτλοδότησης (παράγραφος 2.4.19.10). Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα είναι τα: CDNB, IDNB, 1,2-DBE,alachlor, metolachlor και p-NBC ενώ οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς: atrazin, π-νιτροβενζυλ-GSH, endosulphan, permethrin και fenvalerate (τελική συγκέντρωση 0,1 mM). Οι χημικές δομές των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της δραστηριότητας ή της αναστολής της ενζυμικής δράσης του ενζύμου *GmGSTU4-4*, παρουσιάζονται στο σχήμα 5.25.

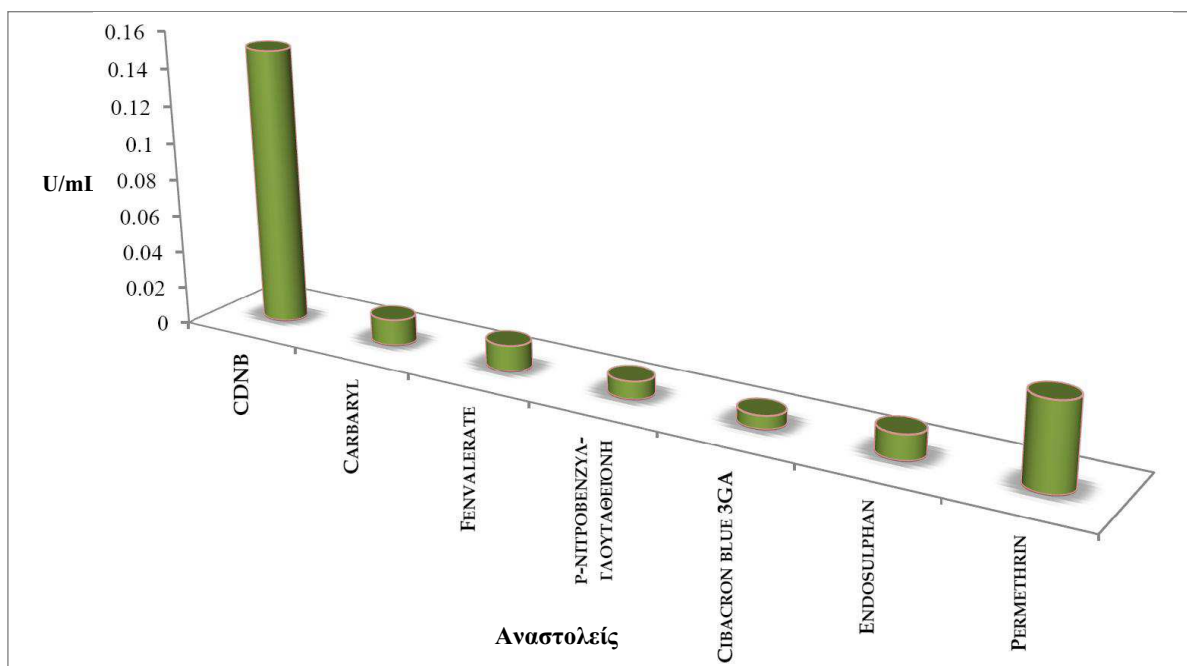
Λόγω της χημικής δομής των ενώσεων, τα άτομα αλογόνου τα οποία βρίσκονται σε ακραίες θέσεις στον ανθρακικό σκελετό, αντιδρούν εύκολα με τη γλουταθειόνη και οδηγούν σε νουκλεόφιλες υποκαταστάσεις (Σχήμα 2.1). Τα αποτελέσματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την ενζυμική δραστηριότητα του *GmGSTU4-4* έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων (Σχήμα 5.24) και αναστολέων (Σχήμα 5.23) σε θερμοκρασία 37 °C

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη μέθοδο συμφωνούν απόλυτα με εκείνα που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τον συμβατικό φωτομετρικό ενζυμικό προσδιορισμό (με κυβέττα στα 340 nm). Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του θειοκυανιούχου σιδήρου είναι $0,98 \pm 0,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και επομένως η συγκεκριμένη αντίδραση προσδιορισμού είναι λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με την πρότυπη CDNB/GSH αντίδραση ($9,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ωστόσο, ο προσδιορισμός με τον θειοκυανιούχο σίδηρο μπορεί να εφαρμοσθεί στις περιπτώσεις ισοενζύμων GST που δεν λειτουργούν ικανοποιητικά χρησιμοποιώντας το CDNB ως υπόστρωμα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αλογονωμένα υποστρώματα όπως τα ζιζανιοκτόνα alachlor, atrazin, and metolachlor προκειμένου να μελετηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου *GmGSTU4-4*. Επίσης εξετάστηκε το συνθετικό υπόστρωμα πνιτροβενζυλ-γλωρίδιο το οποίο αποτελεί ένα «φτωχό», θα λέγαμε, υπόστρωμα για το ένζυμο *GmGSTU4-4* και το 1,2-διβρωμοαιθάνιο ένα άγνωστο υπόστρωμα για τις GSTs της τ τάξης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσία ενζύμου, έδειξαν, διαφορές στην ένταση του χρώματος που υποδεικνύουν διαφορές στην εξειδίκευση του υποστρώματος. Αρνητική τυφλή αντίδραση (απουσία ενζύμου) χρησιμοποιήθηκε για καθένα από τα έξι υποστρώματα προκειμένου να εξαλειφθεί η πιθανότητα ψευδών θετικών αντιδράσεων και όπως ήταν αναμενόμενο τα δείγματα απουσία ενζύμου δεν προκάλεσαν καμία χρωματική αλλαγή. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε για τα συνθετικά υποστρώματα CDNB και IDNB αποτέλεσμα που συμφωνεί με δημοσιευμένη μελέτη για το ένζυμο *GmGSTU4-4* (Axarli et al., 2009). Τέλος, παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμη δραστηριότητα για το 1,2-διβρωμοαιθάνιο που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί άγνωστο υπόστρωμα για το *GmGSTU4-4*.



ΣΧΗΜΑ 5.23. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζυμου *GmGSTU4-4* χρησιμοποιώντας εναλλακτικά υποστρώματα (τελική συγκέντρωση 1mM) σε μικροπλακίδια.

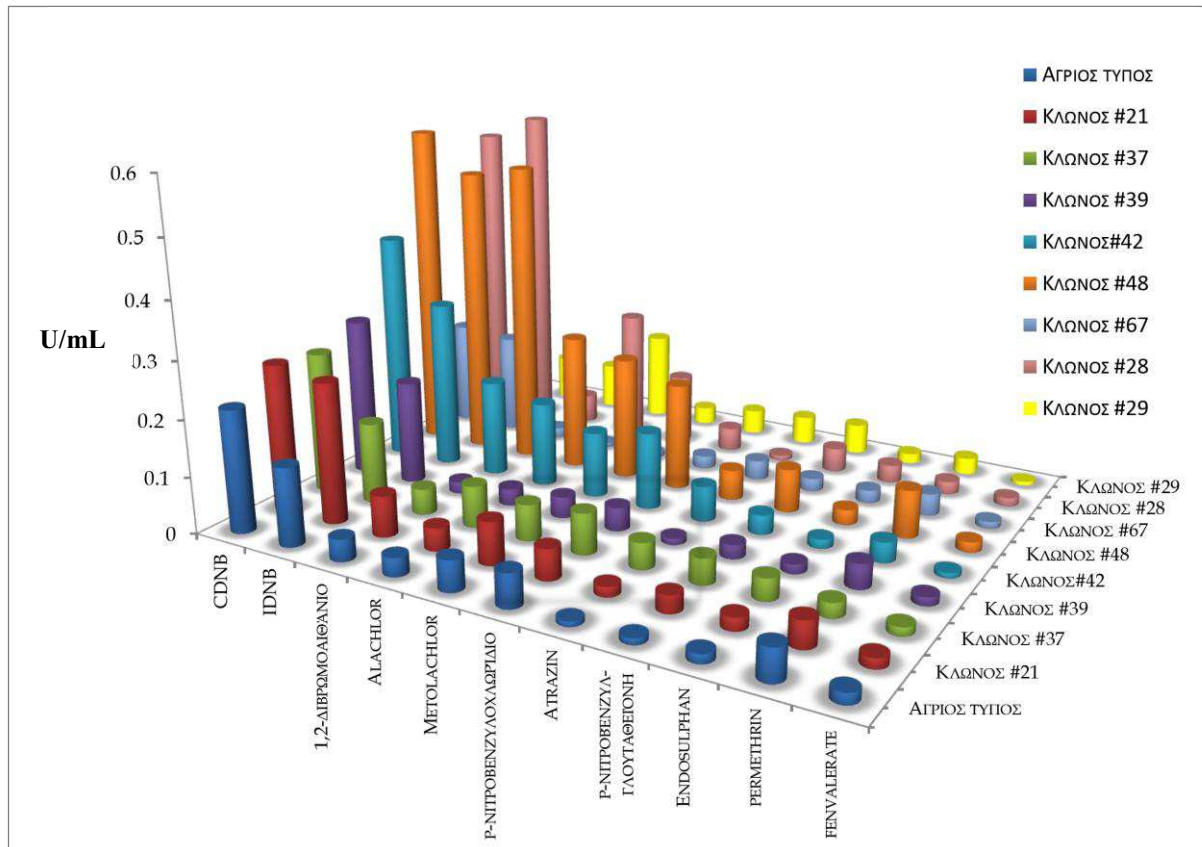


ΣΧΗΜΑ 5.24. Σάρωση επιλεγμένων GSTs αναστολέων: carbaryl, fenvalerate, endosulphan, S-(p-nitrobenzyl)-glutathione, Cibacron blue 3GA και permethrin. Το ένζυμο *GmGSTU4-4* χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις υπό βέλτιστες συνθήκες προσδιορισμού CDNB-GSH. Η πρώτη μπάρα (με τον τίτλο CDNB) αναφέρεται στο θετικό control (απουσία αναστολέα).

5.3.10.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΟΓΟΝΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΑ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΣΑΡΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ GSTs.

Η σάρωση μιας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών GSTs με σκοπό την εύρεση εκείνων με καταλυτική δράση ως προς αλογονωμένες ενώσεις πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον φωτομετρικό προσδιορισμό με πλακίδια που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.19.10. Για να μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων σε έναν αριθμό ενζύμων GSTs, εξεταστήκαν διαφορετικά υποστρώματα και τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή συγκριτικών συμπερασμάτων με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού μπορεί να βρει εξαιρετική εφαρμογή στη σάρωση βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων ενζύμων καθώς παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών μορφών χρησιμοποιώντας ελάχιστες ποσότητες ενζύμου.

Η εύκολη και άμεση μέθοδος που βασίζεται στην οπτική παρατήρηση, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για ταχεία σάρωση πιθανών αναστολέων της ενζυμικής δράσης των GSTs. Τα αποτελέσματα δείχνουν τη φωτομετρική συμπεριφορά του άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών από μία βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε από ανασυναρμολόγηση DNA (DNA shuffling) των ισοενζύμων *GmGSTU4-4*, *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* (Αξαρχή, 2009). Οι πειραματικές δοκιμές για την επίδραση των υποστρωμάτων και των πιθανών αναστολέων στη δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων, πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C (Σχήμα 5.25).



ΣΧΗΜΑ 5.25. Σάρωση επιλεγμένων κλώνων από τη βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων GST ενζύμων χρησιμοποιώντας, εκτός του συστήματος CDNB-GSH, εναλλακτικά υποστρώματα και τέσσερις συνθετικούς αναστολείς (p-nitrobenzyl glutathione, endosulphan, permethrin, και fenvalerate) Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα (0,1 lg/ml συνολική πρωτεΐνη).

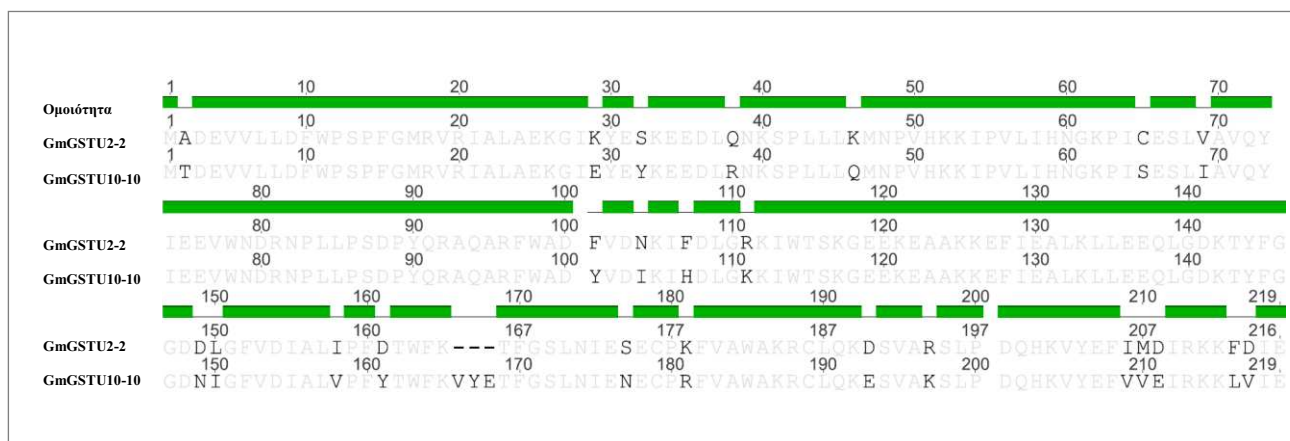
Τα αποτελέσματα (Σχημα 5.25.) έδειξαν διαφορές στην ένταση του χρώματος που αναπτύχθηκε, γεγονός που οφείλεται στη λειτουργική ποικιλότητα ανάμεσα GSTs καθώς και τις αποκλίνουσες αντιδραστικότητες των διάφορων υποστρωμάτων. Αυτό υποδεικνύει ότι ο προσδιορισμός εφαρμόζεται για σάρωση μεταλλαγμένων βιβλιοθηκών ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας πολύ μικρές ποσότητες ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος (0,1 mg/ml ολική πρωτεΐνη). Η μεγαλύτερη δραστηριότητα επιτεύχθηκε με τη μεταλλαγμένη μορφή 48 για το σύνολο των υπό εξέταση υποστρωμάτων. Η μετάλλαξη 42 έδειξε σχετικά υψηλή δραστηριότητα με τα τρία ζιζανιοκτόνα (atrazine, alachlor, and metolachlor). Η χαμηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε για τον κλώνο 21 για όλα τα υπό εξέταση υποστρώματα.

Οι διαφορές στη δραστηριότητα μπορεί να οφείλονται σε μεταβαλλόμενες εγγενείς ιδιοτήτων των μεταλλαγμένων ενζύμων και/ή αλλαγμένων επιπέδων έκφρασης των ενζύμων. Η βιβλιο-

θήκη των μεταλλαγμένων GSTs μελετήθηκε επίσης παρουσία 4 αναστολέων (fenvalerate, endosulphan, permethrin, S-(p-nitrobenzyl)glutathione) (Σχημα 5.25.), χρησιμοποιώντας την CDNB–GSH αντίδραση.

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ένζυμα που ανήκουν στη φυτική τ τάξη των GSTs εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα και διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, τόσο ως προς την αμινοξική ακολουθία όσο και ως προς τα καταλυτικά τους χαρακτηριστικά. Ταυτόχρονα, η τ τάξη αποτελεί μια από τις δυο πολυπληθέστερες τάξεις των φυτικών GSTs με σπουδαία αποτοξινωτική δράση. Η πλειοψηφία των αντιπροσώπων της τ τάξης εμφανίζουν δυνατότητα σύζευξης GSH με ένα ευρύ φάσμα ξενοβιοτικών ουσιών. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από πολύ σημαντικές λειτουργίες όσον αφορά την προστασία των φυτικών κυττάρων καθώς επάγονται κάτω από συνθήκες υποξίας των φυτών και καταπονήσεων από βαρέα μέταλλα και άλατα (Moons, 2003). Παρά τις αξιοσημείωτες ιδιότητες τους, λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τον καταλυτικό μηχανισμό που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες.



ΣΧΗΜΑ 5.26. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 1994). Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα Geneious (Steve Rozen et al., 2000). Η πράσινη μπάρα αντιστοιχεί στον βαθμό ομοιότητας μεταξύ των δύο αλληλουχιών ενώ με μαύρα γράμματα τονίζονται τα διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα μεταξύ τους.

Τα ένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* ανήκουν στην φυτική τάξη τ και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα (pEXP5-CT/TOPO[®]) με σκοπό να μελετηθεί και να ερμηνευτεί ο καταλυτικός τους μηχανισμός. Τα δύο ένζυμα εμφανίζουν ομοιότητα 87,7% σε αμινοξικό επίπεδο (Σχήμα 5.26). Ωστόσο, η κινητική μελέτη και ανάλυση των ενζύμων αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, γεγονός που πιθανότατα δείχνει, τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν συγκεκριμένα αμινοξέα στην κινητική συμπεριφορά και την εξειδίκευση του υποστρώματος των GSTs.

Ο αποδοτικός καθαρισμός των ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή που φέρει GSH ακινητοποιημένη σε αγαρόζη, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βήματα για την πραγματοποίηση κινητικών και μοριακών μελετών με ακρίβεια. Η απόδοση του καθαρισμού ήταν περίπου 100%. Ακολούθησε μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς των πρωτεϊνών κατά την οποία παρατηρήθηκε ότι για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του υποστρώματος CDNB, το ένζυμο *GmGSTU10-10* εμφανίζει σχεδόν τριπλάσια K_m σε σχέση με το *GmGSTU2-2*. Τα δυο ένζυμα εμφάνισαν παρόμοια κινητική συμπεριφορά όταν χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβαλλόμενα υποστρώματα τα fluorodifen και GSH.

Το ένζυμο *GmGSTU4-4* (Axarli et al., 2008), παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία με τα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10*. Η ομοιότητα μεταξύ των τριών αμινοξικών αλληλουχιών φθάνει το 85,4%, ενώ το *GmGSTU2-2* με το *GmGSTU4-4* εμφανίζει ομοιότητα 89,5% εναντι 91,3% που εμφανίζει το ένζυμο *GmGSTU10-10* με το *GmGSTU4-4* (Σχήμα 5.27). Για το ένζυμο *GmGSTU4-4* η αύξηση του μεγέθους του μορίου των υποστρωμάτων φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση στη σταθερά εξειδίκευσης του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη σταθερά εξειδίκευσης (k_{cat}/K_m) του ενζύμου κατά 365-φορές όταν αντί του υποστρώματος CDNB που αποτελείται από ένα αρωματικό δακτύλιο χρησιμοποιηθεί το MTT που αποτελείται από τρεις αρωματικούς δακτυλίους. Το ένζυμο *GmGSTU2-2* φαίνεται επίσης να επηρεάζεται από το μέγεθος του μορίου του υποστρώματος αφού εμφανίζει μείωση στη σταθερά εξειδίκευσης κατά 38-φορές όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το CuOOH αντί του CDNB. Αντίθετα το ένζυμο *GmGSTU10-10*, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το γεγονός αυτό με μόλις υποτετραπλάσια σταθερά εξειδίκευσης με το υπόστρωμα CuOOH σε σύγκριση με το CDNB.



ΣΧΗΜΑ 5.27. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων *GmGSTU2-2*, *GmGSTU10-10* και *GmGSTU4-4* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 1994). Το σχήμα παρήχθη με το πρόγραμμα Geneious (Steve Rozen et al., 2000). Η πράσινη μπάρα αντιστοιχεί στον βαθμό ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών.

Οι T_m των ενζύμων αποτελούν ένδειξη της δομικής σταθερότητας τους. Για τα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* υπολογίστηκαν στους $60,95 \pm 1,03$ °C και $62,43 \pm 0,62$ °C αντιστοίχως. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική σταθερά k_{cat} για το υπόστρωμα CDNB μελετήθηκε για την περιοχή 0-50 °C. Εφαρμόζοντας τις βασικές θερμοδυναμικές εξισώσεις (παράγραφος 5.3.7.), προσδιορίστηκαν οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) και της διαφοράς εντροπίας (ΔS^\ddagger) και ενθαλπίας (ΔH^\ddagger) κατά τη μεταβατική κατάσταση για τα δυο ένζυμα. Η ενέργεια ενεργοποίησης E_a των πρωτεϊνών *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* εμπίπτουν στο εύρος τιμών E_a οι οποίες χαρακτηρίζουν τις περισσότερες αντιδράσεις κατάλυσης από ένζυμα (2 έως 40 Kcal mol^{-1}). Για το ένζυμο *GmGSTU2-2* η μικρότερη τιμή ενέργειας ενεργοποίησης συγκριτικά με το ένζυμο *GmGSTU10-10*, υποδηλώνει ευκολότερη πραγματοποίηση της καταλυτικής αντίδρασης (Γιαννακουδάκης Δ.Α., 1993).

Σε ένα επόμενο βήμα, μελετήθηκε η επίδραση του ιξώδους στις κινητικές σταθερές των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* για το υπόστρωμα CDNB με στόχο την εύρεση του καθοριστικού σταδίου της καταλυτικής αντίδρασης. Το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης για το *GmGSTU2-2* πιθανότατα σχετίζεται με τη χημεία της αντίδρασης ή με κάποια μη ελεγχόμενη από τη διάχυση δομική ανακατάταξη της πρωτεΐνης (Johnson et al., 1993, Labrou et al., 2001). Για το ένζυμο *GmGSTU10-10* φαίνεται πως το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με την απελευθέρωση του προϊόντος της αντίδρασης.

Οι μεταβολές του pH έχουν επιπτώσεις τόσο στη μέγιστη ταχύτητα V_{\max} της ενζυμικής αντίδρασης όσο και στη σταθερά Michaelis K_m . Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του pH στην κινητική παράμετρο V_{\max} της αντίδρασης μελετήθηκε ένα εύρος τιμών pH (6,5 έως 8,5) και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες περιοχές pH και για τα δυο ένζυμα στην οποία η δραστηρότητά τους είναι μέγιστη. Από την γραφική παράσταση της ενζυμικής δραστηρότητας συναρτήσει του pH, φαίνεται ότι το ένζυμο *GmGSTU2-2* εμφανίζει βέλτιστη δράση σε μια περιοχή τιμών κοντά στο 7,5, ενώ το *GmGSTU10-10* κοντά στο 7. Και τα δυο ένζυμα δρουν σε ένα εύρος τιμών pH όπου η πλειοψηφία των GSTs παρουσιάζουν βέλτιστη δράση.

Προκειμένου να διερευνηθεί η αναστολή της δραστηρότητας των ενζύμων από μια ομάδα ξενοβιοτικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας τα εντομοκτόνα: fenvalerate, permethrin, diazinon, malathion, carbaryl, α -cypermethrin, β -cypermethrin, λ -cyhalothrin, dieldrin, aldrin, DDT, endosulfan, propoxur και τα ζιζανιοκτόνα: atrazine, diuron, alachlor, metolachlor. Διαπιστώνεται ότι όσον αφορά την ομάδα των εντομοκτόνων αυτά που προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δραστηρότητας και στα δυο ένζυμα είναι τα permethrin, fenvalerate, λ -cyhalothrin, spirodiclofen και DDT ενώ από το σύνολο των ζιζανιοκτόνων το alachlor. Τα συγκεκριμένα ξενοβιοτικά επιφέρουν αναστολή της ενζυμικής δράσης σε ποσοστό από 46% έως 92%. Θα μπορούσε να ισχυριστεί κανείς ότι δεν προκύπτει εμφανής, τουλάχιστον, συσχέτιση της χημικής δομής των ξενοβιοτικών ουσιών με την αναστολή που αυτές προκαλούν. Στο συμπέρασμα αυτό, οδηγεί το γεγονός ότι οι ενώσεις που αποτελούν τους αποτελεσματικότερους αναστολείς για τα υπό εξέταση ένζυμα, παρουσιάζουν διαφορετικές δομές μεταξύ τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εντομοκτόνο DDT υπό την επίδραση του οποίου, παρατηρείται ελάττωση της εναπομένουσας δραστηρότητας κατά πέντε φορές για το ένζυμο *GmGSTU10-10* συγκριτικά με το ένζυμο *GmGSTU2-2*. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης του ξενοβιοτικού στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών και στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει με τα γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα.

Περαιτέρω μελέτη των ξενοβιοτικών ουσιών που παρουσιάζουν σημαντική αναστολή της δραστηρότητας των ενζύμων *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό των τιμών IC_{50} για καθεμία από τις ξενοβιοτικές ενώσεις alachlor, λ -cyhalothrin, fenvalerate, permethrin, DDT και spirodiclofen. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η IC_{50} είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται για να μειωθεί κατά 50% η ενζυμική δραστηρότητα, οι ενώσεις που αποτέλεσαν τους αποτελεσματικότερους αναστολείς για το ένζυμο *GmGSTU2-2* είναι το fenvalerate και το λ -cyhalothrin. Πιθανόν η παρόμοια δομή των δυο εντομοκτόνων να σχετίζεται με την υψηλή συγγένεια που εμφανίζουν με την πρωτεΐνη. Η ύπαρξη δυο αρωματικών δακτυλίων οι οποίοι συνδέονται μέσω μιας αιθερομάδας χαρακτηρί-

ζει και τις δυο χημικές ενώσεις και ίσως να παίζει ρόλο στην αποτελεσματική πρόσδεση των αναστολέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα πειραματικά αποτελέσματα για την πρωτεΐνη *GmGSTU10-10* έδειξαν ότι το ξеноβιοτικό που εμφανίζει υψηλότερο βαθμό αγγιστείας με το ένζυμο είναι το DDT και σε μικρότερο βαθμό τα fenvalerate και λ-cyhalothrin.

Η μέθοδος προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας που βασίζεται στη μέτρηση των αλογονοιόντων χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ενζύμων GSTs (άγριου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών) έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων και αναστολέων των πρωτεϊνών. Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πέρα των πλεονεκτημάτων της παρουσιάζει και αρκετές δυσκολίες. Προκειμένου ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο ακριβής (ελαχιστοποίηση θορύβου) πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ρυθμιστικών διαλυμάτων και οι κατάλληλες αναλογίες μεταξύ αντιδραστηρίων και πρωτεϊνικού δείγματος. Η εφαρμογή μικρότερων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης δεν επιτρέπει την ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας, ενώ αντίθετα σε μεγαλύτερες τιμές υπάρχει ο κίνδυνος υποεκτίμησης της ενεργότητας λόγω της ταχύτατης απελευθέρωσης των ιόντων αλογόνου κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης. Επιπροσθέτως, επειδή η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση οποιουδήποτε αλογονοϊόντος, πρέπει να αποκλειστούν όλες οι πιθανές πηγές αλογόνων (εκτός βεβαίως των ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα ή πιθανοί αναστολείς) προκειμένου να προσδιοριστεί η απελευθέρωση μόνο των επιθυμητών αλογονοιόντων της ενζυμικής αντίδρασης. Ένας σημαντικός τέτοιος παράγοντας που πρέπει να προβλεφθεί κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, είναι η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται, με οξέα που δεν περιέχουν αλογόνα. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αντιδράσεις της μεθόδου είναι ποσοτικές και στοιχειομετρικές, ο προσδιορισμός της ποσότητας των αλογόνων που παράγονται είναι εφικτός με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη πρέπει να λαμβάνεται με πολλαπλή επανάληψη των πειραματικών σημείων για τη μεγαλύτερη δυνατή εξάλειψη σφαλμάτων.

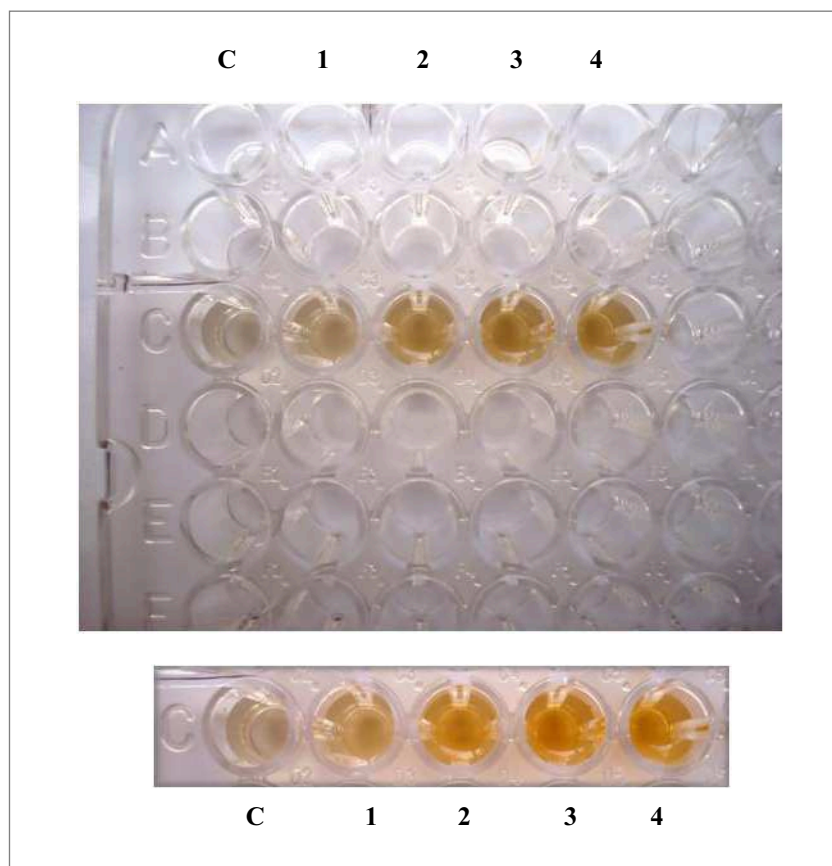
Αρχικά πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του άγριου τύπου χρησιμοποιώντας μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος αλλά και πρωτεΐνης. Μελετήθηκε επίσης η ποσότητα των ιόντων χλωρίου που παράγονται για χρονικό διάστημα 75min λαμβάνοντας μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης αλογονοιόντων συναρτήσει του χρόνου υπέδειξε μια αυξανόμενη απελευθέρωση ιόντων αλογόνου τα πρώτα 20min ακολουθούμενη από σταθεροποίηση της συγκέντρωσης των Cl⁻ που παράγονται έως το πέρας των 75min. Ο μηχανισμός της αντίδρασης απαλογόνωσης του υποστρώματος CDNB μελετήθηκε και με τη λήψη φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες ενζυμικού εκχυλίσματος. Σε ένα εύρος φάσματος από 320nm έως 750nm παρατηρήθηκαν φωτομετρικά η σύζευξη του CDNB με τη γλουταθειόνη (κορυφές στα 340 nm) και

ταυτόχρονα η αντίδραση των θειοκυανιούχων ιόντων με το νιτρικό σίδηρο (κορυφές στα 460nm) τα οποία απελευθερώθηκαν λόγω της αντίδρασης των αλογονοϊόντων με τον σιδηροκυανιούχο υδράργυρο ($\text{Hg}(\text{SCN})_2$). Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση στις τιμές απορρόφησης στα δυο μήκη κύματος, εξαιτίας των αυξανόμενων ποσοτήτων ενζύμου που προστίθενται.

Η μελέτη του άγριου τύπου συνεχίστηκε με έλεγχο της επίδρασης στη δραστικότητα του ενζύμου των υποστρωμάτων CDNB, IDNB, 1,2-DBE,alachlor, metolachlor, p-nitrobenzyl chloride και των αναστολέων atrazin, π-νιτροβενζυλ-γλουταθείο, endosulphan, permethrin, fenavalerate. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει την υψηλότερη ελάττωση της ενζυμικής δραστικότητας υπό την επίδραση του π-νιτροβενζυλ-γλουταθείου και στις δυο θερμοκρασίες. Ανάμεσα στα υποστρώματα, το ιωδο-παράγωγο (1-ιωδο-2,4 δινιτροβενζόλιο) φαίνεται να προκαλεί παρόμοια ενζυμική δραστικότητα με το CDNB ιδιαίτερα όταν το πείραμα διεξάγεται στους 37 °C. Ανάμεσα στα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν, η μικρότερη αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας παρατηρείται για το εντομοκτόνο permethrin.

Έχοντας υπόψη ότι η επιτυχία των πειραμάτων στην κατευθυνόμενη εξέλιξη πρωτεϊνών βασίζεται στις μεθόδους που εφαρμόζονται για τη σάρωση βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων ενζύμων που φέρουν τις επιθυμητές ιδιότητες (Colin et al. 2010, Wu et al., 2010, Kurtovic & Mannervik, 2009). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό και να εκμεταλλευτούμε την ποικιλότητα τέτοιων βιβλιοθηκών, απαιτείται διαθεσιμότητα ταχέων τεχνολογιών που επιτρέπουν την ανάλυση πολλών διαφορετικών ενζύμων ταυτόχρονα και την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών σάρωσης. Η μέθοδος ανίχνευσης αλογονοϊόντων σε μικροπλακίδια όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.4.19.10., βρίσκει εφαρμογή στην ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού ενζύμων που δρουν καταλυτικά υπό την επίδραση αλογονομένων ενώσεων. Ο συγκεκριμένος πειραματικός προσδιορισμός εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς επιτρέπει την εξέταση πλήθους ξενοβιοτικών ενώσεων με τη χρήση ελάχιστων ποσοτήτων ενζύμου. Η οπτική παρατήρηση της χρωματικής αλλαγής της καταλυτικής αντίδρασης λόγω απελευθέρωσης των αλογονοϊόντων επιτρέπει την παράλληλη μελέτη πρωτεϊνικών δειγμάτων με τρόπο ταχύ, άμεσο και αξιόπιστο (Σχήμα 5.28).

Ο χρωματομετρικός προσδιορισμός που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για τη σάρωση μεταλλαγμένων γονιδίων του *GmGSTU4-4* που προέκυψαν από DNA shuffling (Αξαρχλή, 2009). Ακολούθησε σάρωση 8 επιλεγμένων κλώνων χρησιμοποιώντας ακατέργαστο εκχύλισμα κυττάρων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μικροπλακίδια 96 θέσεων (Παράγραφος 5.3.10.3.) χρησιμοποιώντας επτά διαφορετικά υποστρώματα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά του άγριου τύπου (Σχημα 5.25.).



ΣΧΗΜΑ 5.28. Παρουσίαση της χρωματικής αλλαγής του ενζυμικού διαλύματος σε 5 αντιδράσεις απαλογόνωσης που βασίστηκε στη μέθοδο Iwasaki et al., 1952 σε πλάκες. **C:** τυφλό δείγμα (αντίδραση που δεν περιέχει ένζυμο), **θέσεις 1, 2, 3, 4:** αντιδράσεις με αυξανόμενες ποσότητες ενζύμου. Είναι χαρακτηριστική η διαφορά που παρατηρείται στην ένταση του πορτοκαλί χρώματος ενδεικτικής της απελευθέρωσης αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων αλογόνου.

Σε πρώτο επίπεδο, με την εφαρμογή της συγκεκριμένης πειραματικής μεθόδου, εκμεταλλευόμαστε τη χρωματική αλλαγή που προκαλείται από την απαλογόνωση των ενώσεων που εξετάζονται. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται μια αρχική επιλογή θετικών ή μη κλώνων δηλαδή στην πραγματικότητα ενζύμων που έχουν ή όχι τη δυνατότητα να καταλύουν αντιδράσεις απαλογόνωσης. Για αυτόν τον λόγο, άλλωστε, είναι δυνατή η σάρωση μεγάλου αριθμού ενζύμων αλλά και εύρους υποστρωμάτων ή πιθανών αναστολέων. Σε δεύτερο επίπεδο, εξετάζεται το μέγεθος της καταλυτικής δράσης των θετικών κλώνων καθώς και της αναστολής τους με φωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αλογοιοϊόντων που απελευθερώνονται. Κατά αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιείται μια δεύτερη, πιο εξειδικευμένη επιλογή, ανάμεσα στους θετικούς κλώνους που προέκυψαν κατά το πρώτο στάδιο και με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα επιλέγονται αυτοί με την υψηλότερη καταλυτική δράση.

Παρά την σπουδαιότητα των GSTs στον ιατρικό αλλά και περιβαλλοντικό τομέα, περιορισμένες μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την ανάπτυξη μιας εύκολης μεθόδου σάρωσης προκειμένου να απλουστευθεί και να επιταχυνθεί η ανακάλυψη μεταλλαγμένων ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες, καθώς και νέων αλογονωμένων υποστρώματων. Το 2007 δημοσιεύθηκε από τους Kurtovic et al. (2007) μια μέθοδος για τον έλεγχο βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων GST ενζύμων χρησιμοποιώντας ιωδοαλκάνια ως υποστρώματα. Το ιόν ιωδίου που παράγεται από την ενζυμική αντίδραση οξειδώνεται σε ιώδιο, που με την παρουσία αμύλου δίνει μπλε χρώμα που μπορεί να μετρηθεί στα 610 nm. Παρά το γεγονός ότι η ανάλυση είναι ταχεία και ευαίσθητη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο με ιωδιούχο υπόστρωμα.

Πιο πρόσφατα, οι Yasgar et al. (2010) χρησιμοποίησαν ανέπτυξαν έναν ευαίσθητο προσδιορισμό σάρωσης για υποστρώματα GST που βασίζεται στο ένζυμο λουσιφεράση που καταλύει την αντίδραση, σχηματίζοντας με ιόντα μαγνησίου ένα σύμπλοκο και πυροσφωφορικό άλας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο αντιδρά με μοριακό οξυγόνο και εκπέμπεται φως. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, απελευθερώνεται τόση ενέργεια ώστε η διάταξη των ηλεκτρονίων μεταπηδά από το κατώτερο ενεργειακό επίπεδο σε κατάσταση διέγερσης υψηλής ενέργειας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο χάνει ενέργεια εκπέμποντας ένα φωτόνιο ορατού φωτός και επιστρέφει στο κατώτερο ενεργειακό επίπεδο. Ανάλογα με την επίδραση του ενζύμου εκπέμπεται φως διαφορετικού χρώματος, από βαθυπράσινο μέχρι ζωηρό κίτρινο. Σε μια άλλη εργασία αναπτύχθηκε μία μέθοδος σάρωσης σε μικροπλακίδια 384 θέσεων χρησιμοποιώντας το σύστημα προσδιορισμού CDNB / GSH (Zhang et al., 2008). Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη σαρώση GST αναστολέων.

Παράρτημα

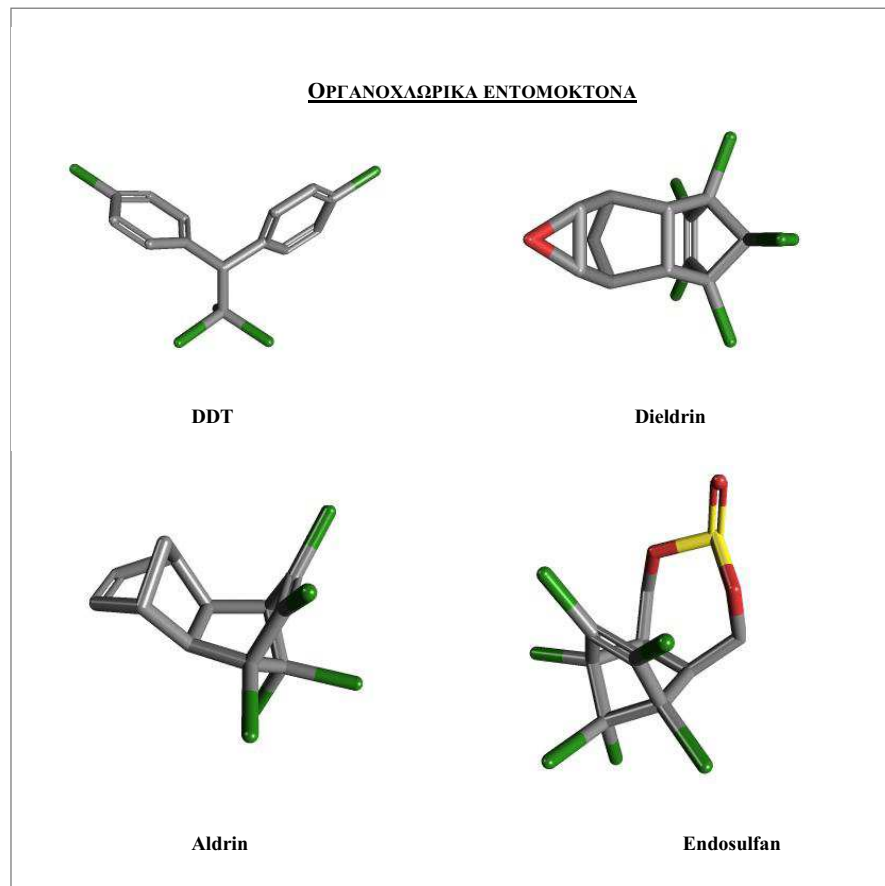
ΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Με βάση τη βιολογική τους δράση δηλαδή τον εχθρό ή την ασθένεια που προορίζονται να αντιμετωπίσουν τα παρασιτοκτόνα διακρίνονται σε διάφορους τύπους.

A. ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

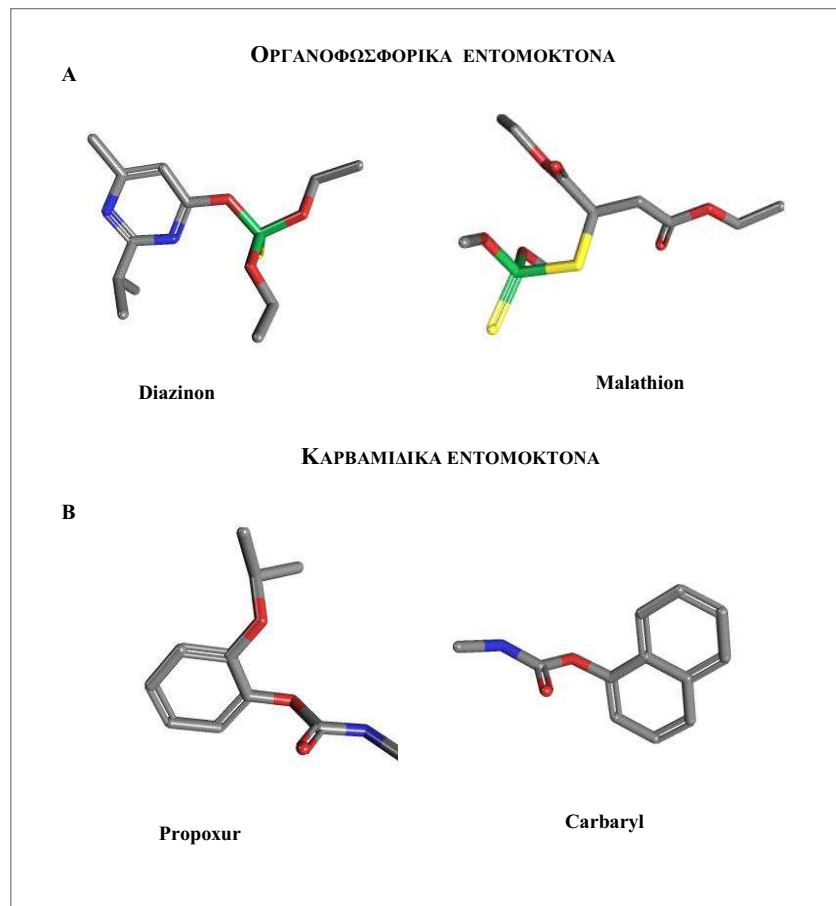
Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση εντόμων που καταστρέφουν τα διάφορα μέρη των φυτών. Πρόκειται για φυσικές ή συνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες αυτούσιες ή σε μείγματα προκαλούν με την τοξική τους δράση τη θανάτωση των εντόμων. Συνιστούν τουλάχιστον το 25% των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η χρήση τους τουλάχιστον για την Καλιφόρνια των ΗΠΑ αυξήθηκε κατά 18% μεταξύ του 1991 και 1995 (Goldman, 2007). Ανάλογα με τη δραστική τους ουσία (χημική σύνθεση και προέλευση) διακρίνονται 4 μεγάλες κατηγορίες που όλες τους έχουν άσχημες επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς και στο περιβάλλον:

- Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες: Χαρακτηριστικό παράδειγμα το DDT. Δεν προκαλούν μόνο οξεία τοξικότητα αλλά και χρόνια τοξικότητα γιατί διατηρούνται για πάρα πολύ καιρό στο περιβάλλον (ακόμα και μετά από 10 χρόνια). Οι νέες γενιές χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες είναι περισσότερο διαλυτοί στο νερό από τους παλαιότερους και με αυτό τον τρόπο κινούνται ευκολότερα στο περιβάλλον. Μακριά από το φως και το οξυγόνο διασπώνται αργά και συνήθως απορροφώνται από οργανισμούς στη βάση της τροφικής αλυσίδας. Στα έντομα ενεργούν δια επαφής και δια στομαχικής δηλητηρίασης. Από τη στιγμή που εισέρχονται σε κάποιον οργανισμό, συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τελικά βρίσκονται σε οργανισμούς στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας όπως ο άνθρωπος και τα πουλιά (Fishel, 2005). Οι χημικές δομές των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στο Σχήμα :



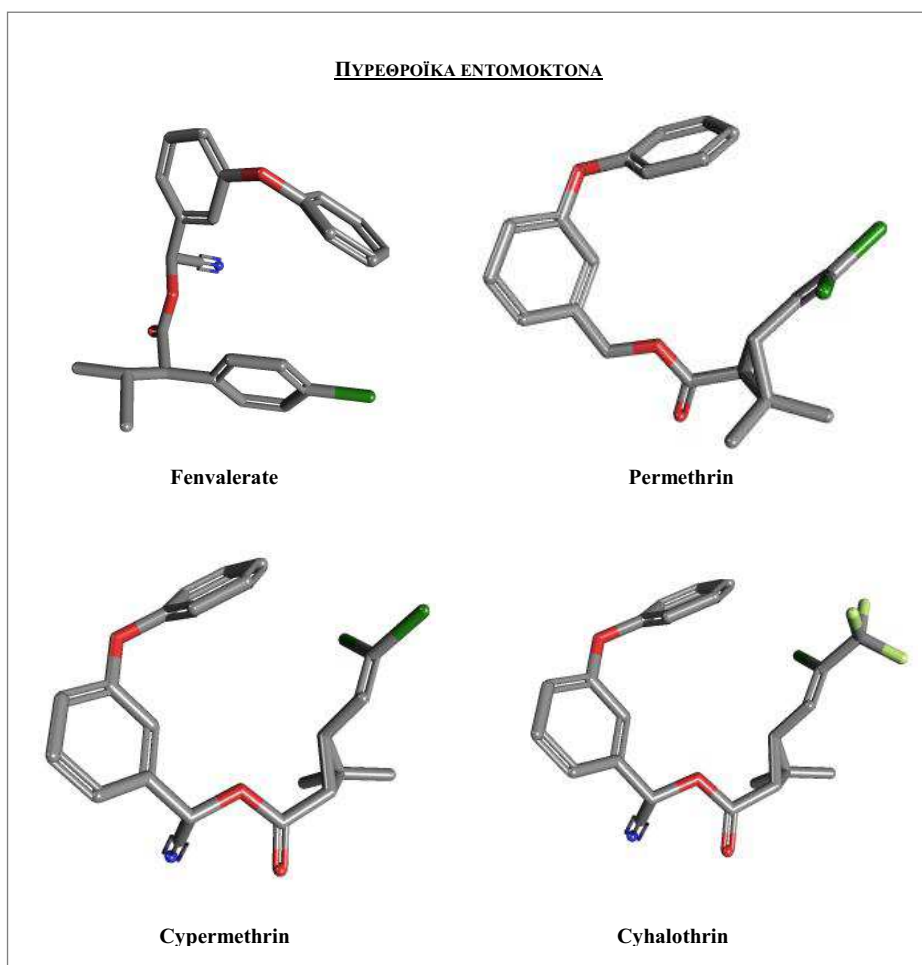
ΣΧΗΜΑ 6.1. Συντακτικοί τύποι των οργανοχλωρικών εντομοκτόνων DDT (π, π'-διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο), Dieldrin, Aldrin και Endosulfan.

- Οργανοφωσφορικά και Καρβαμιδικά (αναφέρονται μαζί επειδή επιδρούν με παρόμοιους τρόπους): Καθώς πολλοί από τους παλαιούς χλωριωμένους υδρογονάνθρακες έχουν απαγορευτεί, η αγροχημική βιομηχανία στράφηκε σε νέα λιγότερο επίμονα χρονικά μα αμεσότερα τοξικά σκευάσματα, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά. Δεν συσσωρεύονται στους ιστούς και στο λίπος των οργανισμών αλλά επιδρούν ενεργώντας στο νευρικό σύστημα των εντόμων καθώς και των ανθρώπων, ψαριών, άλλων θηλαστικών και πουλιών. Μπλοκάρουν την παραγωγή ενός ενζύμου που ονομάζεται χολινεστεράση και οι οργανισμοί που τα δέχτηκαν έχουν ακανόνιστους νευρικούς παλμούς. Αποτελέσματα της δράσης τους είναι η αρρυθμία, η ακανόνιστη αναπνοή, το τρεμούλιασμα και σε μεγάλες δοσολογίες ο θάνατος. Χαρακτηρίζονται ως τα περισσότερο τοξικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Από μελέτες που έγιναν στη Μ. Βρετανία μεταξύ 1995 και 2001 έγινε φανερό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των δηλητηριάσεων των μελισσών οφείλονταν σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά (Oldroyd, 2007).



ΣΧΗΜΑ 6.2. Συντακτικοί τύποι των εντομοκτόνων **A:** Diazinon και Malathion (οργανοφωσφορικά) και **B:** Propoxur και Carbaryl (καρβαμιδικά).

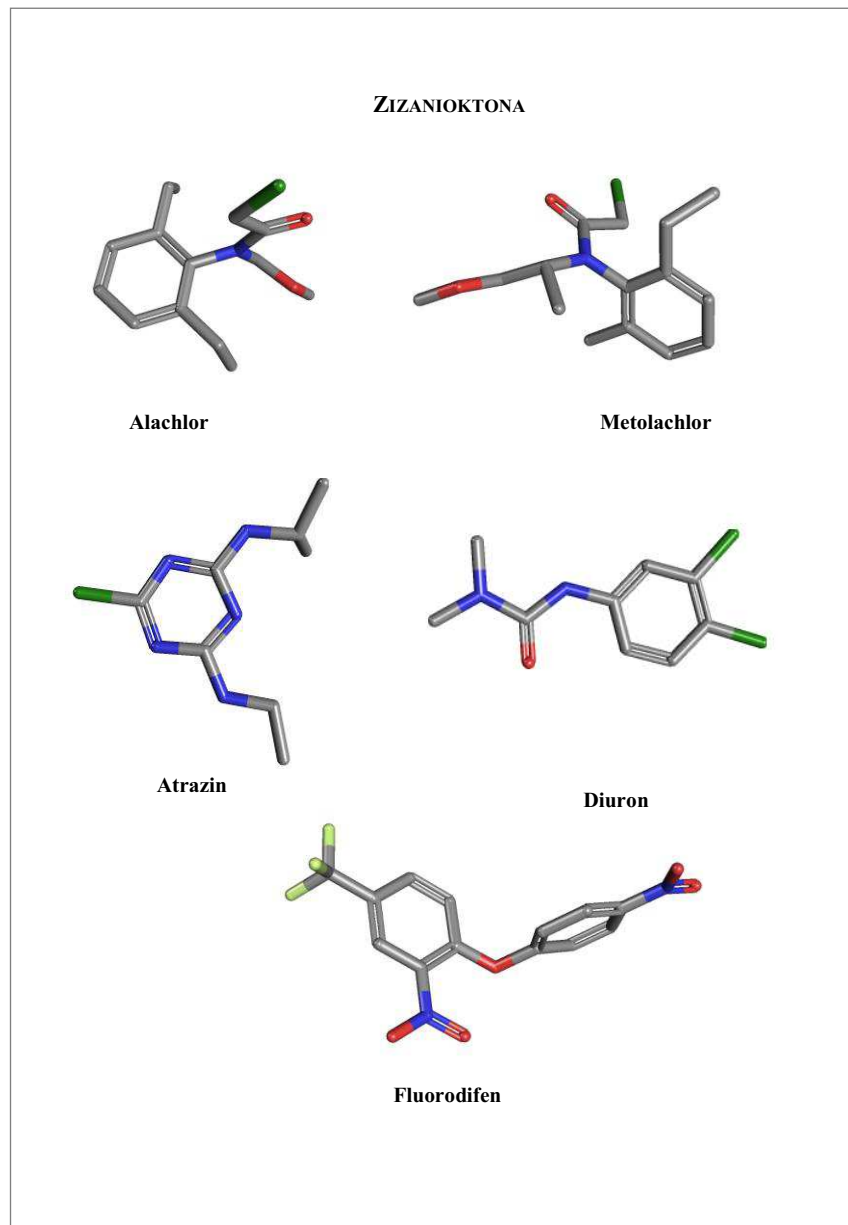
- **Συνθετικά πυρεθροειδή:** Είναι συνθετικά παραγόμενες πυρεθρίνες, δηλαδή ουσίες που φυσιολογικά προέρχονται από συγκεκριμένα είδη του χρυσάνθεμου. Τα συνθετικά πυρεθροειδή δρουν με παρόμοιο τρόπο με τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες. Επίσης περιέχουν χλώριο το οποίο βοηθάει στη διατήρησή τους στο περιβάλλον. Στα πυρεθροειδή αποδίδονται και ενδοκρινικές διαταραχές. Ενώ αναφέρονται ως μέσου τύπου τοξικότητας για τα θηλαστικά και τα πουλιά, θεωρούνται πολύ τοξικά για τα έντομα και τα ψάρια (Weston et al., 2010). Η χρήση τους αυξάνεται συνεχώς (σε ποσότητες αλλά και σε αγρούς δέκτες) και επειδή η δράση τους στα έντομα είναι παρόμοια με εκείνη των χλωριωμένων υδρογονανθράκων, η ανησυχία για την αυξανόμενη ανθεκτικότητα των εντόμων στα μεν ή στα δε αυξάνεται επίσης συνεχώς.



ΣΧΗΜΑ 6.3. Συντακτικοί τύποι των πυρεθροϊκών εντομοκτόνων Fenvalerate, Permethrin, Cypermethrin και Cyhalothrin.

B. ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ζιζανίων. Με τον όρο «ζιζάνια» εννοούμε τα αυτοφυή φυτά που φυτρώνουν και αναπτύσσονται αυτοδύναμα μέσα στο χώρο μιας καλλιέργειας χωρίς να έχουν σπαρθεί. Τα ζιζάνια συνήθως υπερτερούν, σε συνθήκες ανταγωνισμού των καλλιεργούμενων φυτών επιδεικνύοντας υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού καθώς επίσης και μεγάλη προσαρμοστικότητα σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αποτέλεσμα αυτών των χαρακτηριστικών τους είναι να στερούν από τα καλλιεργούμενα φυτά θρεπτικά στοιχεία, νερό και συχνά ζωτικό χώρο ανάπτυξης (Kellogg et al., 2000).



ΣΧΗΜΑ 6.4. Συντακτικοί τύποι των ζιζανιοκτόνων Alachlor, Metolachlor, Atrazin, Diuron και Fluorodifen.

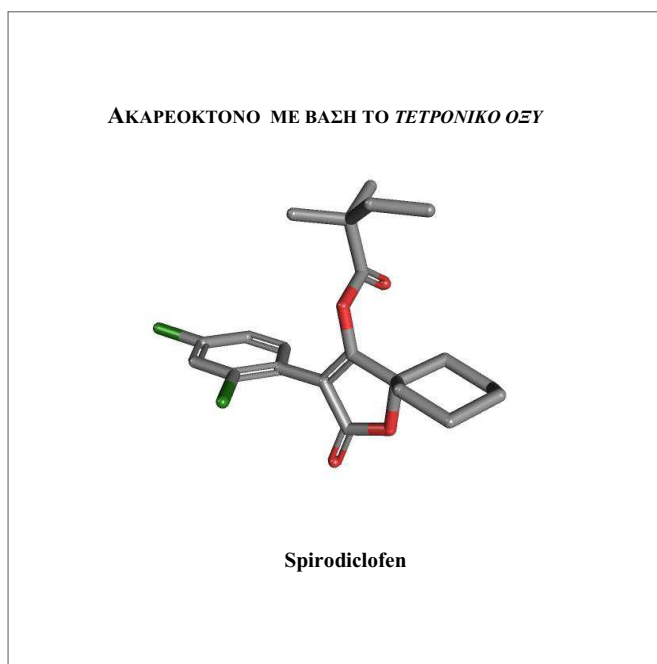
Τα ζιζανιοκτονα είναι οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ζιζανίων (αγρωστωδών – πλατύφυλλων), που αναπτύσσονται σε καλλιεργούμενες και μη εκτάσεις. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες ζιζανιοκτόνων που έχουν εξειδικευμένη – εκλεκτική δράση (είτε σε πλατύφυλλα, είτε σε αγρωστώδη) ή καθολική (Greene & Rohanish, 2005).

Με τη συνεχιζόμενη πίεση για λιγότερη ανθρώπινη εργασία στην αγροτική παραγωγή, η χρήση ζιζανιοκτόνων αυξήθηκε πολύ. Κάποια από αυτά παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκρι-

μένων ενζύμων και τα φυτά πεθαίνουν, κάποια άλλα παρεμποδίζουν τη φωτοσύνθεση και κάποια άλλα την παραγωγή πρωτεϊνών. Αν και τα περισσότερα δεν προκαλούν οξεία τοξικότητα όπως τα εντομοκτόνα, θεωρούνται όμως ως πιθανά για ανθρώπινη καρκινογένεση. Κάποια από αυτά επίσης ενοχοποιούνται και για ενδοκρινικές διαταραχές (Gilden et al., 2010). Υπάρχει ακόμα μεγάλη έλλειψη γνώσης στις επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων. Η γνωστότερη επίδρασή τους στα ωφέλιμα έντομα και τους επικονιαστές είναι οι διαταραχές στο οικοσύστημα και τις συνθήκες διαβίωσης των εντόμων.

Γ. ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ

Τα ακαροκτόνα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ακάρεων. Παρ' όλο το γεγονός ότι αρκετά εντομοκτόνα επιδεικνύουν και ακαρεοκτόνο δράση, υπάρχουν ορισμένες δραστικές ουσίες που χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένη τοξική δράση εναντίον των ακάρεων και χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σαν ακαρεοκτόνα. Τα ακαρεοκτόνα ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες, για πρακτικούς όμως λόγους διακρίνονται ανάλογα με το στάδιο των ακάρεων στο οποίο δρουν. Έτσι χαρακτηρίζονται σαν ωοκτόνα, νυμφοκτόνα ή ακμαιοκτόνα, ενώ πολλά επιδεικνύουν ταυτόχρονα περισσότερες από μια δράσεις (Mullen et al., 2009).



ΣΧΗΜΑ 6.5. Συντακτικός τύπος του μυκητοκτόνου Spirodiclofen.

Το spirodiclofen ανήκει στη νέα χημική ομάδα των τετρονικών οξέων και είναι παρεμποδιστής της σύνθεσης λιπιδίων (TETR, tetronic acid derivatives). Παρουσιάζει εξαιρετική δράση εναντίον των τετρανύχων σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους (Rauch and Nauen 2002).

Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα συμπεριλαμβάνονται επίσης τα:

Μυκητοκτόνα-βακτηριοκτόνα τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση μυκήτων και βακτηρίων που προσβάλλουν τα φυτά. Πρόκειται για ουσίες που προκαλούν θανάτωση ή παρεμποδίζουν την αύξηση ή την αναπαραγωγή ή τη δυνατότητα τους για πρόκληση ασθένειας. Πάντως αναλογικά η χρήση χημικών μέσων για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων ή βακτηρίων είναι παγκόσμια μικρότερη από ότι για την καταπολέμηση εντόμων και ακάρεων ή ζιζανίων. Αυτό οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στη χρησιμοποίηση ποικιλιών φυτών που είναι ανθεκτικές στις ασθένειες. Άλλες εναλλακτικές μέθοδοι θα μπορούσαν επίσης να αναπτυχθούν εναντίων ασθενειών που σήμερα αντιμετωπίζονται με χημική καταπολέμηση. Και πάλι όμως δεν υπάρχουν προοπτικές για υποκατάσταση των φυτοφαρμάκων παρά σε μικρό μόνο ποσοστό. Πάντως βελτιώσεις είναι δυνατές όσον αφορά τον περιορισμό των περιττών εφαρμογών φυτοφαρμάκων και την ελάττωση των κινδύνων που αυτές συνεπάγονται (Καπετανάκης Ε., 2005).

Οι όροι ‘μυκητοκτόνο’ και ‘βακτηριοκτόνο’ ετυμολογικά υποδηλώνουν ενώσεις που θανατώνουν τους αντίστοιχους μικροοργανισμούς. Οι ίδιοι όροι όμως χρησιμοποιούνται και στην περίπτωση ενώσεων που δεν προκαλούν το θάνατο, αλλά μόνο παρεμποδίζουν την αύξηση των φυτοπαθογόνων, έχουν δηλαδή μυκητοστατική ή βακτηριοστατική δράση.

Στη χημική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων θα πρέπει να περιληφθεί και η χρήση ενώσεων που δεν εμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου, αλλά μόνο την παραγωγή σπορίων (αντισπορογόνα), καθώς και ενώσεων που αυξάνουν την αντοχή του ξενιστή ή επηρεάζουν την αλληλεπίδραση ξενιστή - παθογόνου παρεμποδίζοντας την παραγωγή ασθένειας ή μειώνοντας την ένταση της (αντιπαθογονικοί παράγοντες). Πρόσφατες εργασίες επιτρέπουν να ελπίζουμε ότι ενώσεις της τελευταίας αυτής κατηγορίας μπορεί να εισαχθούν σύντομα για ευρεία χρήση στη γεωργική πράξη (Δημόπουλος Β., 1998).

Τα **νηματοδοκτόνα**, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση νηματωδών.

Τα **τροφτικοκτόνα**, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση τρωκτικών και άλλων θηλαστικών.

Οι **φυτορυθμιστικές ουσίες**, οι οποίες είναι οργανικές ενώσεις που δεν αποτελούν θρεπτικά συστατικά, δεν περιέχουν δηλαδή στο φυτό ενέργεια ή απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία και που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προάγουν, παρεμποδίζουν ή τροποποιούν ποιοτικά την

αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Ανάλογα με την προέλευση τους διακρίνονται σε φυσικές και συνθετικές (Δημόπουλος Β., 1998).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P. (2003). Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of molecular biology.* 326, 151-165.
- Ahuja, S.K., Sanjeev, K., Ferreira, Gisela, M., Moreira, Antonio, R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 125–154.
- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L., Ramuz, M. (1993). Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* 175, 7869.
- Allen, M.R., Audoly, L.P., Gabel, C.A.: US20030131370 (2003).
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M.W., Di Ilio, C. (1999). Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS Lett.* 445, 347-50.
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Polekhina, G., Rossjohn, J., Parker, M.W., Di Ilio, C. (2000). Evaluation of the role of two conserved active-site residues in beta class glutathione S-transferases. *Biochem J.* 2, 341-6.
- Allocati, N., Masulli, M., Pietracupa, M., Federici, L., Di Ilio, C. (2006). Evolutionarily conserved structural motifs in bacterial GST (glutathione S-transferase) are involved in protein folding and stability. *Biochem. J.* 394, 11–17.
- Anandarajah, K., Kiefer, P.M. Jr., Donohoe, B.S., Copley, S.D. (2000). Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol. *Biochemistry* 39, 5303–5311.
- Anders, M.W., Lash, L., Dekant, W., Elfarra, A.A., Dohn, D.R. (1988). Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol.* 18, 311-41.

- 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. *Anal Chim Acta.* 460, 151-161.
- Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C., Suarez, J.E. (1990a). Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Lett.* 263, 77–79.
- Arca, P., Hardisson, C., Suárez, J.E. (1990b). Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 34, 844-8.
- Arca, P., Rico, M., Brana, A.F., Villar, C.J., Hardisson, C., Suarez, J.E. (1988). Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1552-1556.
- Armstrong, R.N. (1994). Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 69, 1–44.
- Armstrong, R.N. (2000). Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* 39, 13625–13632.
- Armstrong, R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 10, 2–18.
- Armstrong, R.N., Cook, P.D. and Brown, D.W. (2010). Structure, Function and Evolution of Fosfomycin Resistance Proteins in the Vicinal Oxygen Chelate Superfamily Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations. Rudesheim/Rhein, Germany.
- Arnold, F.H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalysts design. *Nature.* 409, 253–257.
- Atkinson, H.J., Babbitt, P.C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry.* 48, 11108-11116.
- Axarli, I.A., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E. (2009). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifeninducible 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.

- Bader, R. and Leisinger, T. (1994). Isolation and characterization of the *Methylophilus sp. strain DM11* gene encoding dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase. *J Bacteriol* 176, 3466–3473.
- Baillie, T.A., Kassahun, K. (1994). Reversibility in glutathione-conjugate formation. *Adv Pharmacol.* 27, 163–181.
- Baillie, T.A. and Slatter, J.G. (1991). Glutathione: a vehicle for the transport of chemically reactive metabolites in vivo. *Acc Chem Res.* 24, 264–270.
- Bajpai, P. (2004). Biological bleaching of chemical pulps. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 1–58.
- Baker, E.N., Hubbard, R.E. (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 44, 97-179.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science* 289, 905-919.
- Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G. (1997). Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett.* 410, 210-212.
- Basantani, M. and Srivastava, A. (2007). Plant glutathione transferases – a decade falls short. *Can. J. Bot.* 85, 443–456.
- Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *J. Struct. Biol.* 142, 66-76.
- Berhane, K., M. Widersten, A. Engström, J. W. Kozarich, and B. Mannervik. (1994). Detoxification of base propenals and other α,β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1480–1484.
- Bernat, B.A., Laughlin, L.T., Armstrong, R.N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry.* 36, 3050-5.

Bergsagel, D.E., Sprague, C.C., Austen, C. & Griffith, K.M. (1962). Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Chemother.* 21, 87.

Blum, M. (1967). On the Size of Machines, *Information and Control.* 11, 257-265.

Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Esteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J. (2000). Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 275, 24798–24806.

Board, P. G., Coggan M., M. C. J. Wilce, and M. W. Parker. (1995). Evidence for an essential serine residue in the active site of the theta class glutathione transferases. *Biochem. J.* 311, 247–250.

Bogaards, J.J., Venekamp, J.C., van Bladeren, P.J. (1997). Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol.* 10, 310-317.

Booth, J., Boyland, E., Sims, P. (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516–524.

Boyland, E., and Chasseaud, L. F. (1969). Glutathione S-alkyltransferase *Biochem. J.* 115, 985–990.

Boyland, E., and Chasseaud, L.F. (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 32,173-219.

Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol.Med.* 27, 951–96.

Brown, B. W., and Newey W. (2002). Generalized Method of Moments, Efficient Bootstrapping, and Improved Inference. *Journal of Business and Economics Statistics.* 20, 507-517.

- Bruggeman, I.M., Temmink, J.H., van Bladeren, P.J. (1986). Glutathione- and cysteine-mediated cytotoxicity of allyl and benzyl isothiocyanate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 83, 349-59.
- Bryant, B.M., Jarman, M., Ford, H.T., Smith, I.E. (1980). Prevention of isophosphamide-induced urothelial toxicity with 2-mercaptoethane sulphonate sodium (mesnum) in patients with advanced carcinoma. *Lancet.* 2, 657-659.
- Burgin, M. (2005). Super-recursive algorithms, *Monographs in computer science*, Springer.
- Burgin, M. (1982). Generalized Kolmogorov complexity and duality in theory of computations, *Notices of the Russian Academy of Sciences.* 25, 19-23.
- Burgin, M. and Debnath, N. (2003). Hardship of Program Utilization and User-Friendly Software, in *Proceedings of the International Conference "Computer Applications in Industry and Engineering"*, Las Vegas, Nevada, pp. 314-317.
- Caccuri, A.M., Ascenzi, P., Antonini, G., Parkeri, M. W., Oakleyi, A., Chiessi, E., Nuccetelli, M., Battistoni, A., Bellizia, A., Ricci, G. (1996). Structural Flexibility Modulates the Activity of Human Glutathione Transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase. *J Biol Chem.* 271, 16193-16198.
- Caccuri, A.M., Lo, B.M., Nuccetelli, M., Nicotra, M., Rossi, P., Antonini, G., Federici, G., Ricci, G. (1998). Proton release upon glutathione binding to glutathione transferase P1-1: kinetic analysis of a multistep glutathione binding process. *Biochemistry.* 37, 3028-3034.
- Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leigh, J.A., Nester, E.W. (1987). Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J Bacteriol.* 169, 2086-2091.
- Casalone, E., Allocati, N., Ceccarelli, I., Masulli, M., Rossjohn, J., Parker, M. W. and Di Ilio, C. (1998). *FEBS Lett.* 423, 122-124.
- Cavalca, L., Guerrieri, N., Colombo, M., Pagani, S., Andreoni, V. (2007). Enzymatic and genetic profiles in environmental strains grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 315–325.

Chamberlain, M.P., Lock, E.A., Gaskell, B.A., Reed, C.J. (1998). The role of glutathione S-transferase- and cytochrome P450-dependent metabolism in the olfactory toxicity of methyl iodide in the rat. *Arch Toxicol.* 72, 420-428.

Chan, H. S. and Dill, K. A. (1988). Intrachain loops in polymers: Effects of excluded volume. *J. Chem. Phys.* 90, 492–509.

Chayen, N.E. (1998). Comparative studies of protein crystallization by vapour diffusion and microbatch techniques. *Acta Cryst.* D54, 8-15.

Chen, J.G., Willard, F.S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S. A., Jones, A.M., and Siderovski, D. P. (2003). A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301, 1728–1731.

Cheng, Y., Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22, 3099–3108.

Chernov, A. (2003). Protein crystals and their growth. *J. Struct. Biol.* 142, 3-21.

Chesney, J.A., Easton, J.W., Mahoney, J.R. (1996). Bacterial Glutathione: a Sacrificial Defense against Chlorine Compounds. *J Bacteriology* 178, 2131-2135.

Chica, R.A., Doucet, N., Pelletier, J.N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 378–384.

Cho, C.M.H., Mulchandani, A., Chen, W. (2002). Bacterial cell surface display of organophosphorous hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agent. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2026–2030.

Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H., Lee, W.H. (2003). Optical biosensor consisting of glutathione S-transferase for detection of captan. *Biosens Bioelectron.* 18, 1461–1466.

Clarke, E.D., Greenhow, D.T., Adams, D. (1998). Metabolism-related assays and their application to agrochemical research: Reactivity of pesticides with glutathione and glutathione transferases. *Pestic Sci.* 54, 385-393.

- 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.
- Cole, D.J., Cummins, I., Edwards, R. (2004). US20046730828.
- Coles, B., Ketterer, B. (1990). The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 25, 47-70.
- Colin D.Y., Deprez-Beauclair P., Silva N., Infantes L., Kerfelec B. (2010). Modification of pancreatic lipase properties by directed molecular evolution, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 365–373.
- Combes, B., and G. S. Stakelum. (1961). A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. clin. Invest.* 40, 981.
- Copley, S.D., Dhillon, J.K. (2002). Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol.* 3.
- Cover, M.T., Thomas A. J. (1991). *Elements of information theory*, 1st Edition. New York: Wiley-Interscience. ISBN 0-471-06259-6.
- Covolo, L., Placidi, D., Gelatti, U., Carta, A., Scotto Di Carlo, A., Lodetti, P., Piccichè, A., Orizio, G., Campagna, M., Arici, C., Porru, S. (2008). Bladder cancer, GSTs, NAT1, NAT2, SULT1A1, XRCC1, XRCC3, XPD genetic polymorphisms and coffee consumption: a case-control study. *Eur J Epidemiol.* 23, 355-62.
- Creighton, T. E. (1988). Disulphide bonds and protein stability. *BioEssays* 8, 57–63.
- Cursino, L., Mattos, S.V., Azevedo, V., Galarza, F., Bückner, D.H., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. (2000). Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *Sci Total Environ.* 261, 109-113.
- Danenberg, K.D. (2006). US20067138507.
- Dasgupta, S., and Bell, J.A. (1993). Design of helix ends. *Int J Pept Protein Res.* 41, 499-511.

Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., and Orcutt, B. C. (1978). A model for evolutionary change in proteins. In Dayhoff, M. O., editor, Atlas of Protein Sequence and Structure. 5, 345-352.

DeCleene, M., and DeLey, J. (1976). The host range of crown gall. Bot. Gaz. 42, 389.

De Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J., Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnol. 16, 839.

DeLano, W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, USA.

Debnath, N.C. and Burgin, M. (2003). Software Metrics from the Algorithmic Perspective, in Proceedings of the ISCA 18th International Conference “Computers and their Applications”, Honolulu, Hawaii, pp. 279-282

Dekant, W., Vamvakas, S. Anders, M.W. (1994). Formation and fate of nephrotoxic and cytotoxic glutathione S-conjugates: cysteine conjugate beta-lyase pathway. Adv Pharmacol. 27, 115-162.

Dietze, E.C., Wang, R.W., Lu, A.Y.H., Atkins, W.M. (1996). Ligand effects on the fluorescence properties of tyrosine-9 in alpha 1-1 glutathione S-transferase. Biochemistry. 35, 6745–6753.

Di Ilio, C., Aceto, R. Piccolomini, N. Allocati, A. Faraone, L. Cellini, G. Ravagnan, and G. Federici. (1988). Purification and characterisation of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. Biochem. J. 255, 971–975.

Di Ilio, C., Aceto, A., Piccolomini, R., Allocati, N., Faraone, A., Bucciarelli, T., Barra, D., Federici, G. (1991). Purification and characterization of a novel glutathione transferase from *Serratia marcescens*. Biochim Biophys Acta. 1077, 141–146.

Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Piccolomini, R., Bucciarelli, T., Dragani, B., Faraone, A., Sacchetta, P., Petruzzelli, R., Federici, G. (1993). Characterization of glutathione transferase from *Xanthomonas campestris*. Arch Biochem Biophys. 305, 110–114.

Ding, Y., Ortell, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H. (2003). The Anopheles gambiae glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics. 4, 35–50.

- Dirr, H., P. Reinemer, and R. Huber. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.* 220, 645–661.
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. (1998a). Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Mol. Biol.* 36, 75-87.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. (1998b). Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opini. Plant Biol.* 1, 258–266.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 277, 30859–30869.
- Dixon, D.P., McEwen, A.G., Laphorn, A.J., Edwards, R. (2003). Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 23930–23935.
- Dornetshuber, J., Bicker, W., Lämmerhofer, M., Lindner, W., Karwan, A., Bursch, W. (2007). Impact of stereochemistry on biological effects of permethrin: induction of apoptosis in human hepatoma cells (HCC-1.2) and primary rat hepatocyte cultures. *BMC Pharmacology.* 7, A65.
- Dowd, A.J., Steven, A., Morou, E., Hemingway, J., Vontas, J., Painea M.J.I. (2009). A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme and Microbial Technology.* 45, 164–168.
- Drost, D.C., Buren, L.L., Jepson, I., Daly, A. (2000). WO0052182.
- Dünki, R.M. (1991). The estimation of the Kolmogorov entropy from a time series and its limitations when performed on EEG. *Bull Math Biol.* 53, 665-678.
- Durbin, S. D. and Feher, G. (1996). Protein crystallization. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47, 171-204.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5, 193-198.

Edwards, R., Dixon, D.P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 169-186.

El Fantroussi, S. and Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* 8, 268–275.

Tocheva, E.I., Fortin, P.D., Eltis, L.D., Murphy, M.E.P. (2006). Structures of Ternary Complexes of BphK, a Bacterial Glutathione S-Transferase That Reductively Dechlorinates Polychlorinated Biphenyl Metabolites. *The Journal of Biological Chemistry.* 281, 30933–30940.

Enayati, A.A., Vontas, J.G., Small, G.J., McCarroll, L., Hemingway, J. (2001). Quantification of pyrethroid insecticides from treated bednets using a mosquito recombinant glutathione S-transferase. *Med Vet Entomol.* 15, 58-63.

Fagain, C. O. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1252, 1-14.

Fahey, R. C., and A. R. Sundquist. (1991). Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 64, 1–53.

Fahey, R.C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 55, 333-356.

Fan, Y.X., McPhie, P., Miles, E.W. (2000). Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects. *Biochemistry.* 39, 4692-4703.

Favaloro, B., Tamburro, A., Trofino M.A., Luciano B., Domenico R., Heipieper H.J. (2000). Modulation of the glutathione S-transferase in *Ochrobactrum anthropi* : function of xenobiotic substrates and other forms of stress. *Biochem. J.* 346, 553-559.

Favaloro, B., Tamburro, A., Angelucci, S., De Luca, A., Melino, S., Di Ilio, C., Rotilio D. (1998). Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Ochrobactrum anthropi*. *Biochem J.* 335, 573–579.

Federici, L., Masulli, M., Bonivento, D., Di Matteo, A., Gianni, S., Favalaro, B., Di Ilio, C., Allocati, N. (2007). Role of Ser11 in the stabilization of the structure of *Ochrobactrum anthropi* glutathione transferase. *Biochem J.* 403, 267-274.

Feher, G. and Kam, Z. (1985). Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays, *Methods Enzymol.* 114, 78-110.

Felsenstein, J. (1989). Phylip—Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.

Ferretti, M., Destro, T., Tosatto, S.C.E., La Rocca, N., Rascio, N., Masi, A. (2009). Gamma-glutamyl transferase in the cell wall participates in extracellular glutathione salvage from the root apoplast. *New Phytol.* 181, 115-126.

Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A. (1998). Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem.* 273, 329-337.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408, 239-247.

Fisher, B., Carbone, P., Economou, S.G., Frelick, R., Glass, A., Lerner, H., Redmond, C., Zelen, M., Band, P., Katrych, D.L., Wolmark, N., Fisher, E.R. (1975). 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. *N Engl J Med.* 292, 117-122.

Flory, P. J. (1956). Theory of Elastic Mechanisms in Fibrous Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5222–5235.

Fragoulaki, M.N., Axarli, I.A., Labrou, N.E., Clonis, Y.D (2007). Recombinant glutathione S-transferase for the determination of the herbicide alachlor: The foundations of an optical biosensor. 1st UK-US Conference on Chemical and Biological Sensors and Detectors. London, UK.

Frear, D.S. and Swanson, H.R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2S-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123–2132.

Fromm, H. J. (1975). *Initial Rate Enzyme Kinetics*, Springer-Verlag, New York.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. 293, 668-672.

Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A.J., Rudge, S.A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S., Rebecchi, M.J. (1995). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry* 34, 16228–16234.

Gardner, J.L., and Gallagher, E.P. (2001). Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase alpha 4-4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 390, 19-27.

Garman, E. F. and Schneider, T. R. (1997). Macromolecular cryocrystallography, *J. Appl. Cryst.* 30, 211-237.

Gekko, K., and Timasheff S.N. (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*. 20, 4667–4676.

Giegé, R., Lorber, B. and Théobald-Dietrich, A. (1994). Crystallogensis of biological macromolecules: Facts and perspectives, *Acta Cryst. D50*, 339-350.

Gilden, R.C., Huffling, K., Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 39, 103–10.

Gilman, A. and Philips, F.S. (1946). The biological actions and therapeutics applications of B-chloroethyl amines and sulfiles. *Science* 103, 409.

Ginger, G., Light, J.R, Mahan, V.P., Roxas, R.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.

Goldenberg, G.J. (1974). Drug-induced stimulation of nitrogen mustard and choline transport and other systems in L5178Y lymphoblasts in vitro. *Cancer Res.* 34, 2511-2516.

Goldman, L.R. (2007). Managing pesticide chronic health risks: U.S. policies. *Journal of Agromedicine*. 12, 57-75.

Goldstein, J., and Combes, B. (1966). Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein-glutathione conjugation. *J. Lab. Clin. Med.* 67, 863-872.

Graminski, G.F., Kubo, Y., Armstrong, R.N. (1989). Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase. *Biochemistry*. 1989 Apr 18;28(8):3562-8. Erratum in: *Biochemistry*. 28, 7138.

Green, T. (1997). Methylene chloride induced mouse liver and lung tumours: an overview of the role of mechanistic studies in human safety assessment. *Hum Exp Toxicol* 16, 3-13.

Greene, S.A. and Pohanish, R. P. (2005). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*. SciTech Publishing, Inc.

Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens S., Hell R., Meyera A.J. (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. *FEBS Letters*. 580, 6384-6390.

Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R., and Meyer, A.J. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione Sconjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581, 3131-3138.

Guida, W.C. (1994). Software for structure-based drug design, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 777-781.

Gullner, G., Kömives, T., Rennenberg, H. (2001). Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *J Exp Bot.* 52, 971-979.

Gulick, A. M. and Fahl W. E. (1995). Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8140-8144.

Gustafsson, A., Etahadieh, M., Jemth, P. and Mannervik, B. (1999). The C-terminal region of human glutathione transferase A1-1 affects the rate of glutathione binding and the ionization of the active-site Tyr9. *Biochemistry* 38, 16268-16275.

Güven, M., Görgün, E., Unal, M., Yenerel, M., Batar, B., Küçümen, B., Dinç, U.A., Güven, G.S., Ulus, T., Yüksel, A. (2011). Glutathione S-Transferase M1, GSTT1 and GSTP1 Genetic Polymorphisms and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res.* 46, 31-37.

Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin Chim Acta.* 326, 131-142.

Habig, H.W., Pabst, J. M., and Jakoby, B.W. (1974). Glutathione S-Transferases The first enzyme step in mercapturic acid formation. *Biol Chem.* 249, 7130-7139.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press (Oxford and New York) 3rd edition xxxi, 936 p.

Harper, E.T., Rose, G.D. (1993). Helix stop signals in proteins and peptides: The capping box. *Biochemisfry* 32, 7605-7609.

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.

Haskell, C.M. (1990). *Cancer Treatment*. Philadelphia, WB Saunders, 883–892.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45, 51–88.

Hayes, J.D. and McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.

- Hayes, J.D. and Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
- Hederos, S., Broo, K.S., Jakobsson, E., Kleywegt, G.J., Mannervik, B., Baltzer, L. (2004). Incorporation of a single His residue by rational design enables thiol-ester hydrolysis by human glutathione transferase A1-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 13163-13167.
- Helmer, G., Duesing, J., Rothstein, S., Scarafia, L., Chilton, M.-D., Lai, H.-C., Tu, J., Chen-Pei, D. (1991). US5073677 .
- Hillard, M. L., Gordon, L. P., Roger, H.H., Hurd D.D., Wolff S.N., Herzig G.P. (2008). High-Dose Melphalan and the Development of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: 25 Years Later. 26. 1
- Hiratsuka, A., Hirose, K., Saito, H., Watabe, T. (2000). 4-Hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers: (S)-selective inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and detoxification by rat glutathione S-transferase A4-4. *Biochem J.* 3, 729-35.
- Hiratsuka, A., Okada, T., Nishiyama, T., Fujikawa, M., Ogura, K., Okuda, H., Watabe, T., Watabe, T. (1994). Novel theta class glutathione S-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 278-284.
- Hiratsuka, A., Tobita, K., Saito, H., Sakamoto, Y., Nakano, H., Ogura, K., Nishiyama, T., Watanabe, T. (2001). (S)-Preferential detoxification of 4-hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers by hepatic glutathione S-transferase isoforms in guinea-pigs and rats. *Biochem. J.*, 355, 237-244.
- Hoes, I., Lemièrre, F., Van Dongen, W., Vanhoutte, K., Esmans, E.L., Van Bockstaele, D., Berneman, Z., Deforce, D., Van den Eeckhout, E.G. (1999). Analysis of melphalan adducts of 2'-deoxynucleotides in calf thymus DNA hydrolysates by capillary high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 736, 43-59.

- Hofer, B., Backhaus, S., Timmis, K.N. (1994). The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene*. 144, 9–16.
- Holm, P.J., Bhakat, P., Jegerschold, C., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Morgenstern, R., Hebert, H. (2006). Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. *J Mol Biol*, 360, 934-945.
- Holm, P.J., Morgenstern, R., Hebert, H. (2002). The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22121 crystals. *Biochim Biophys Acta*. 1594, 276-285.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). ‘VMD Visual Molecular Dynamics’. *J. Molec. Graphics*. 14.1, 33-38.
- Hussey, A. J. and Hayes, J. D. (1992). *Biochem. J*. 286, 929-935.
- Hyeyoung, P., Youn-Kyoo, C. (2010). Evaluation of the biodegradation feasibility of antibiotics by three bacteria involving glutathione S-transferases. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 37, 814-819.
- Ibarra, C.A., Chowdhury, P., Petrich, J.W., and Atkins, W.M. (2003). The anomalous pKa of Tyr-9 in glutathione S-transferase A1-1 catalyzes product release. *J. Biol. Chem*. 278, 19257–19265.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1989). Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol*. 171, 6039-6042.
- Inoue, Y.H., M. do Carmo Avides, M. Shiraki, P. Deak, M. Yamaguchi, Y. Nishimoto, A. Matsukage, and D.M. Glover. (2000). Orbit, a novel MT-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol*. 149,153–166.
- Inoue, H., Nojima, Okayama. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96, 23-28.
- Iwasaki, I., Utsumi, S., Ozawa, T. (1952). New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. *Bull. Chem. Soc. Japan*. 25, 226.

Jacob, M., Schmid, F.X. (1999). Protein folding as a diffusional process. *Biochemistry* 38, 13773-13779

Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. (2000). Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 20-24.

Jakobsson, P.J., Thorén, S., Morgenstern, R., Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7220-7225.

Jakoby, W.B . and Habig, W.H. (1980). Glutathione transferases. In *Enzymatic Basis of Detoxication*, Edited by W. B. Jakoby. NewYork : Academic Press. 2, 63-94.

Javitt, N.B, Wheeler, H.O., Baker, K.J., Ramos, O.L., Bradley, S.E. (1960). The intrahepatic conjugation of sulfobromophthalein and glutathione in the dog. *J Clin Invest.* 39, 1570–1577.

Jegerschold, C., Pawelzik, S. C., Purhonen, P., Bhakat, P., Gheorghe, K. R., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Morgenstern, R., Jakobsson, P. J., Hebert, H. (2008). Structural basis for induced formation of the inflammatory mediator prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 11110–11115.

Jemth, P., and Mannervik, B. (2000). Active-site serine promotes stabilization of the reactive glutathione thiolate in rat glutathione transferase T2-2. Evidence against proposed sulfatase activity of the corresponding human enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 8618-8624.

Jencks W. P. (1969). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York.

Jepson, I., Lay, V.J., Holt, D.C., Bright, S.W.J, Greenland, A.J. (1994). Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Mol Biol*; 26, 1855-1866.

Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R. N. and Gilliland, G. L. (1992). The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu class gene. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution. *Biochemistry* 31, 10169-10184.

Ji , X., von Rosenvinge, E.C., Johnson, W.W., Tomarev, S.I., Piatigorsky, J., Armstrong, R.N., Gilliland, G.L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*. 34, 5317-5328.

Johansson, A.S., Mannervik, B. (2001). Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 276, 33061–33065.

Jowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D. (2001). Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem J.* 359, 507-516.

Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, M., Ramuz, G., Allardet-Servent, A.J. (1998). Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *Bacteriol.* 180, 2749.

Jung, U., Cho, Y.S., Seong, H.M., Kim, S.J., Kim, Y.C, Chung, A.S. (1996). Characterization of a novel glutathione S-transferase from *Pseudomonas sp DJ77*. *J Biochem Mol Biol* 29, 111–115.

Jung, G., Breitmaier, E., Voelter, W. (1972). Dissociation equilibrium of glutathione. A Fourier transform-¹³C-NMR spectroscopic study of pH-dependence and of charge densities *Eur. J. Biochem.* 24, 438–445.

Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P.N., Makris, A.M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/oxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J Biol Chem.* 275, 29207-29216.

Kanally, R.A. and Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* 182, 2059–2067.

Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. and Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell.* 90, 1085-1095.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331-338.

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. *Biosens Bioelectron.* 24, 498-503.

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.

Katti, S.K., LeMaster, D.M., Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J Mol Biol.* 212, 167-184.

Keen, J.H., Jakoby, W.B. (1978). Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem.* 253, 5654-5657.

Keller, C., Ballard, L., Lemons, R., Ali-Osman, F. (2002). WO0208465.

Keller, U., Huber, M., Beyer, T.A., Kumin, A., Siemes, C., Braun, S., Bugnon, P., Mitropoulos, V., Johnson, D.A., Johnson, J.A. (2006). Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing. *Mol Cell Biol.* 26, 3773-3784.

Kellogg, R.L., Nehring, R., Grube, A., Goss, D.W., Plotkin, S. (2000). Environmental indicators of pesticide leaching and runoff from farm fields. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service.

Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 985-991.

Klaassen, C.D. (1996). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Companies Inc., New York.

Kohler-Staub, D., and T. Leisinger. (1985). Dichloromethane dehalogenase of *Hyphomicrobium sp. strain DM2*. J. Bacteriol. 162, 676–681.

Kolm, R. H., Danielson U. H., Zhang Y. S., Talalay P., Mannervik B. (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. Biochem. J. 311, 453–459.

Kolm, R.H., Sroga, G.E., Mannervik, B. (1992). Participation of the phenolic hydroxyl group of Tyr-8 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1. Biochem J. 285, 537-540.

Kong, K.-H., Takasu, K., Inoue, H., Takahashi, K. (1992). Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 194-197.

Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H., Bork, P., Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1c contains a glutathione transferase domain - Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. Protein Sci. 3, 2045-2054.

Kosloff, M., Han, G.W., Krishna, S.S., Schwarzenbacher, R., Fasnacht, M., Elsliger, M.A., Abdubek, P., Agarwalla, S., Ambing, E., Astakhova, T., Axelrod, H.L., Canaves, J.M., Carlton, D., Chiu, H.J., Clayton, T., DiDonato, M., Duan, L., Feuerhelm, J., Grittini, C., Grzechnik, S.K., Hale, J., Hampton, E., Haugen, J., Jaroszewski, L., Jin, K.K., Johnson, H., Klock, H.E., Knuth, M.W., Koesema, E., Kreuzsch, A., Kuhn, P., Levin, I., McMullan, D., Miller, M.D., Morse, A.T., Moy, K., Nigoghossian, E., Okach, L., Oommachen, S., Page, R., Paulsen, J., Quijano, K., Reyes, R., Rife, C.L., Sims, E., Spraggon, G., Sridhar, V., Stevens, R.C., van den Bedem, H., Velasquez, J., White, A., Wolf, G., Xu, Q., Hodgson, K.O., Wooley, J., Deacon, A.M., Godzik, A., Lesley, S.A., Wilson, I.A. (2006). Comparative Structural Analysis of a Novel Glutathione S-Transferase (Atu5508) from *Agrobacterium tumefaciens* at 2.0 Å Resolution. Proteins. 65, 527–537.

Kramers, H. A. (1940). Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. Physica. 7, 284-304.

Krissinel, E. and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. 372, 774-797.

- Kriksunov, I.A., Schuller, D.J., Campbell, A.M., Barrett, J., Brophy, P.M., Hao, Q.(2003). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a new class of glutathione transferase from nematodes. *Acta Cryst. D59*, 1262-1264.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1871.
- Kuntz, I.D., *Structure - Based Strategies for Drug Design and Discovery.* (1992). *Science.* 257, 42-48.
- Kurtovic, S., Shokeer, A., Mannervik, B. (2008). Diverging catalytic capacities and selectivity profiles with haloalkane substrates of chimeric alpha class glutathione transferases. *Protein Eng Des Sel.* 21, 329–341.
- Kurtovic S., and Mannervik B. (2009). Identification of emerging quasi-species in directed enzyme evolution, *Biochemistry.* 48, 9330–9339.
- 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., Karavangeli, M., Tsaftaris, A., Clonis, Y.D. (2005). Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalyzing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta.* 222, 91–97.
- Labrou, N.E., Ridgen, D.J., Clonis, Y.D. (2004). Engineering the pH-dependence of kinetic parameters of maize glutathione S-transferase I by site-directed mutagenesis. *Biomol. Eng.* 21, 61–66.
- Labrou N.E., Mello L.V., Clonis Y. D. (2001). The conserved Asn49 of maize glutathione S-transferase I modulates substrate binding, catalysis and intersubunit communication. *Eur. J. Biochem.* 268, 3950-3957.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Laidler, K. J. (1997). *Chemical Kinetics*, Third Edition, Benjamin-Cummings.

Laidler, K. J. and Bunting, P. S. (1973). *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.

La Roche, S. and Leisinger, T. (1990). Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione S-transferase supergene family. *J Bacteriol.* 172, 164–171.

Lavalette, D., Tetreau C., Tourbez M., Blouquit Y.. (1999). Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment. *Biophys. J.* 76, 2744-2751.

Lee, H.-C., and C.-P. D. Tu. (1995). *Drosophila* glutathione S-transferase D27: functional analysis of two consecutive tyrosines near the N-terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 327–334.

Leisinger, T., Bader R., Hermann R., Schmid-Appert M., Vuilleumier S.. (1994). Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation* 5, 237–248

Lenhof, H.P. (1995). An algorithm for the protein docking problem, *From Nucleic Acid and Proteins to Cell Metabolism*, edited by D.Schomburg and U.Lessel. pp. 125-139.

Li, Y.J., Scott, W.K., Zhang, L. (2006). Revealing the role of glutathione S-transferase omega in age-at-onset of Alzheimer and Parkinson diseases. *Neurobiol Aging.* 27, 1087-1093.

Li, M. and Vitányi P. (1997). *An Introduction to Kolmogorov Complexity and Its Applications*, Springer.

Lim, K., Ho, J.X., Keeling, K., Gilliland, G.L., Ji, X., Rüker, F., Carter, D.C. (1994). Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci.* 3, 2233-2244.

Liu, S., Zhang, P., Ji, X., Johnson, W. W., Gilliland, G. L., Armstrong, R. N. (1992). Contribution of Tyrosine 6 to the catalytic mechanism of isoenzyme 3-3 of glutathione S-transferase, *J. Biol. Chem.* 267, 4296-4299.

Lloyd-Jones, G. and Lau, P.C. (1997). Glutathione S-transferase- encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* 63, 3286–3290.

- Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. (2000). Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility, *Biochim Biophys Acta*. 1543, 1-10.
- Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. (2000). Revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility, *Biochim Biophys Acta*. 1543, 1-10.
- Lopez, M. F., Patton, W. F., Sawlivich, W. B., Erdjument-Bromage, H., Barry, P., Gmyrek, K., Hines, T., Tempst, P. and Skea, W. M. (1994). A glutathione S-transferase (GST) isozyme from broccoli with significant sequence homology to the mammalian theta-class of GSTs. *Biochim. Biophys. Acta*. 1205, 29-38.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B. III, de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S, Richardson D.C. (2002). Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 50, 437-450.
- Lucas, R. W., Larson, S. B., McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of bromo mosaic virus, *J. Mol. Biol.* 317, 95-108.
- Mandal, A. K., Skoch, J., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Christmas, P. (2004). The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 6587–6592.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warholm, M. Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7202–7206.
- Mannervik, B., Danielson, U.H. (1988). Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. 23, 283-337.
- Mannervik, B., Guthenberg, C., Jakobson, I. & Warholm, M. (1978). Conjugation Reactions in Drug Biotransformation (Aitio, A., ed.), pp. 101-110, Elsevier, Amsterdam.
- Mannervik, B. (2008). Molecular enzymology of the glyoxalase system. *Drug Metabol Drug Interact*. 23, 13-27.

- Marrs, K. A., Alfenito M. R., Lloyd A. M., Walbot V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375, 397–400.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure*. 3, 245–250.
- Martin, J.L., Bardwell, J.C., Kuriyan, J. (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature*. 365, 464-468.
- Masai, E., Katayama, Y., Kubota, S., Kawai, S., Yamasaki, M., Morohoshi, N. (1993). A bacterial enzyme degrading the model lignin compound *p*-coumarate is a member of the glutathione S-transferase superfamily. *FEBS Lett.* 323, 135-140.
- Masai, E., Kubota, S., Katayama, Y., Kawai, S., Yamasaki, M., Morohoshi, N. (1993). Characterization of the C alpha-dehydrogenase gene involved in the cleavage of beta-aryl ether by *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57, 1655-1659.
- Mashburn, L. T., and Wriston, J. C., Jr. (1963). Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 50-55.
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G. (2006.) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal.* 8, 753–762.
- Masurel, D., Houghton, P.J., Young, C.L., Wainer, I.W. (1990). Efficacy, toxicity, pharmacokinetics, and in vitro metabolism of the enantiomers of ifosfamide in mice. *Cancer Res.* 50, 252-255.
- Matsumura, M., Signor, G., Matthews B.W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*. 342, 291 – 293.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- May, J.M., Qu, Z.C., Neel. D.R., Li, X. (2003). Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1640, 153-161.
- McCarthy, D.L., Navarrete, S., Willett, W.S., Babbitt, P.C. Copley, S.D. (1996). Exploration of the relationship between tetrachlorohydroquinone dehalogenase and the glutathione S-transferase superfamily. *Biochemistry.* 35, 14634-14642.

- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.M., Koeppe, M.K., O'Keefe, D.P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124, 1105-1120.
- Mcgonigle, B., O'Keefe, D.P. (2001). US20016168954.
- McGonigle, B., O'Keefe, D.P. (2000). WO0047747.
- McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals, Wiley and Sons, Inc., New York.
- McPherson, A., Malkin, A., Kuznetsov, Y. (1995). The science of macromolecular crystallization. *Structure.* 3, 759-768.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205–17208.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 653-671.
- Mezey, P.G. (2000). Computer Aided Drug Design: Some Fundamental Aspects. *J.Mol.Model.* 6, 150-157.
- Meyer, D. J. (1993). Significance of an unusually low K_m for glutathione in glutathione transferases of the *a*, *m* and *p* classes. *Xenobiotica.* 23, 823–834.
- Meyer, D. J., and B. Ketterer. (1995). Purification of soluble human glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 252, 53–65.
- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J.* 274, 409-414.
- Meyer, D., Grease, D.J. and Ketterer, B. (1995). Forward and reverse catalysis and product sequestration by human glutathione S-transferase in the reaction of GSH with dietary aralkyl isothiocyanates. *Biochem. J.* 306, 565–569.

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 Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 57, 1726-1728.

Mullen G. R. Mullen G., Durden L. (2009). *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press. pp. 525.

Milligan, A.S., Daly, A., Parry, M.A.J., Lazzeri, P.A., Jepson, I. (2001). The expression of a maize glutathione S-transferase in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vivo. *Mol Breed*. 7, 301-305.

Mills, G. C. (1958). The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. *J. Biol. Chem*. 234.

Mitchell, M. (2009). *Complexity: A Guided Tour* (Oxford University Press, Oxford).

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 Cryst. D57*, 1726-1728.

Moore, L., Giles, K.L., Atherly, A.G. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae* Eds. Academic Press, New York, 15-46.

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

Morgenstern, R., Meijer, J., Depierre, J.W., Ernster, L. (1980). Characterization of rat-liver microsomal glutathione S-transferase activity. *Eur J Biochem*. 104, 167-174.

Morgenstern, R., DePierre, J.W., Lind, C., Guthenberg, C., Mannervik, B., Ernster, L. (1981). Benzo(alpha)pyrene quinones can be generated by lipid peroxidation and are conjugated with glutathione by glutathione S-transferase b from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 99, 682-690.

- Morgenstern, R. and DePierre, J.W. (1983). Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition. *Eur. J. Biochem.* 134, 591-597.
- Morou, E., Ismail, H.M., Dowd, A.J., Hemingway, J., Labrou, N. (2008). A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. *Anal Biochem.* 378, 60–64.
- Morrow, C.S., Smitherman, P.K., Diah, S.K., Schneider, E., Townsend, A.J. (1998). Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. *J Biol Chem.* 273, 20114–20120.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O., Pritchard, P.H. (1990). Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl Environ Microbiol.* 56, 1079–1086.
- Mueller, L., Goodman, C.D., Silady, R.A., Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561-1570.
- Nandhagopal, N., Simpson, A. A., Gurnon, J. R., Yan, X., Baker, T. S., Graves, M. V., Van Etten, J. L., Rossman, M. G. (2002). The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 14758-14763.
- Newton, G. L., Arnold K., Price M. S., Sherill C., Delacardayre S. B., Aharonowitz Y., Cohen G., Davies J., Fahey R. C., Davis C.. (1996). Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.* 178, 1990–1995.
- Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knablein, J., Prade, L., Mann, K., Bieseler, B. (1997a). Cloning, sequencing, crystallization and x-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. *mutin*: A leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *Journal of Molecular Biology.* 274, 577-587.
- Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., Bieseler, B. (1997b) Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: Evidence for an induced-fit mechanism. *Journal of Molecular Biology.* 274, 446-453.

Nishida, M., Kong H., Inoue H., Takahashi K. (1994). Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. The conserved tyrosyl residue near the N terminus is not essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 269, 32536–32541.

Nishida, M., Harada, S., Noguchi, S., Satow, Y., Inoue, H., Takahashi K. (1998). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys¹⁰ and His¹⁰⁶. *J. Mol. Biol.* 281, 135–147.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.* 62, 581594.

Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F., De Bellis, L. (2006). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Rep.* 25, 997-1005.

Nohynek, L.J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Suhonen, E.L., Busse, H.J., Mohammadi, M., Hantula, J., Rainey, F., Salkinoja-Salonen, M.S. (1996). Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1T, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 1042-1055.

Oakley, A. J., Lo Bello, M., Ricci, G., Federici, G., Parker, M. W. (1998). Evidence for an induced-fit mechanism operating in pi class glutathione transferases. *Biochemistry.* 37, 9912-9917.

Ochoa, M. (1969). Alkylating Agents in Clinical Cancer Chemotherapy *Annals of the New York Academy of Sciences.* 163, 921-930.

O'Brien, P. J. and Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem. Biol.* 6, 91–105.

Ohkamu-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A.F., Xiang, C., and Oliver, D.J. (2007a). Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49, 865-877.

Oldenburg, R. A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C. J., Devilee, P. (2007). Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol.* 63: 125–149.

- 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, 1-8.
- Oldroyd, B.P. (2007). What's Killing American Honey Bees? *PLoS Biol.* 5, 168.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A., Barnett, B. J. (1988). Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 263, 11820–11825.
- Pakhomova, S., Rife, C.L., Armstrong, R.N., Newcomer, M.E. (2004). Structure of fosfomycin resistance protein FosA from transposon Tn2921. *Protein Sci.* 13, 1260-1265.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J., Wright, D.A. (1996). QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies* 9, 3-4.
- Parida, A., George, S. (2007). WO2007029271.
- Parsons, J.A., Meunier, P., Podbesek, R., Reeve, J., Stevenson, R.W. (1981). Pathological and therapeutic implications of the cellular and humoral responses to parathyryn. *Biochem Soc Trans.* 9, 383-386.
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., Jain, R.K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends Biotechnol.* 23, 135–142.
- Pemble, S. E. and Taylor, J. B. (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class theta glutathione transferase cDNA. *Biochem. J.* 287, 957-963.
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J.* 319, 749-754.
- Penninckx, M. J., and M. T. Elskens. (1993). Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 34, 239–301.

Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Dragani, B., Polsinelli, M., Aceto, A., Di Ilio, C. (1996). Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochem J.* 318, 157-162.

Petsko, G. A. (1975). Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryoprotective mother liquors for protein crystals, *J. Mol. Biol.* 96, 381-392.

Piccolomini, R., Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G., Federici, G. (1989). Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J Gen Microbiol.* 135, 3119–3125.

Piccolomini, R., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A., Di Ilio, C. (1991). Purification of a GSH-affinity binding protein from *Bacteroides fragilis* devoid of glutathione transferase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 66, 101-105.

Pieper, D.H., Martins dos Santos, V.A., Golyshin, P.N. (2004). Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr Opin Biotechnol.* 15, 215-224.

Poland, D. C. and Scheraga, H. A. (1965). Statistical mechanics of noncovalent bonds in polyamino acids. VIII. Covalent loops in proteins. *Biopolymers.* 3, 379–399.

Polekhina, G., Board, P.G., Blackburn, A.C., Parker, M.W. (2001). Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity. *Biochemistry.* 40, 1567–1576.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology.* 66, 1499–1503.

Rai, K.R., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G.A., Larson, R.A., Cheson, B.D., Schiffer, C.A. (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343, 1750–1757.

Raillard, S., Krebber, A., Chen, Y., Ness, J.E., Bermudez, E., Trinidad, R., Fullem, R., Davis, C., Welch, M., Seffernick, J., Wackett, L.P., Stemmer, W.P., Minshull, J. (2001). Novel enzyme activities and functional plasticity revealed by recombining highly homologous enzymes. *Chem. Biol.* 8, 891–898.

Raza, H., Robin, M.A., Fang, J.K., Avadhani, N.G. (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J.* 366, 45-55.

Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O., Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *Embo J.* 10, 1997-2005.

Reinemer, P., Prade L., Hof P., Neufeind T., Huber R., Zettl R., Palme K., Schell J., Koelln I., Bartunik H. D., Bieseler B.. (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289–309.

Rhode, G. (1993). *Crystallography made crystal clear*, Academic Press, Inc.

Ricci, G., Caccuri, A. M., Lo Bello, M., Rosato, N., Mei, G., Nicotra, M., Chiessi, E., Mazzetti, A. P., Federici, G. (1996). Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Role of helix 2 flexibility in the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 271, 16187-16192.

Rife, C.L., Pharris, R.E., Newcomer, M.E., Armstrong, R.N. (2002). Crystal structure of a genomically encoded fosfomycin resistance protein (FosA) at 1.19 Å resolution by MAD phasing off the L-III edge of Tl(+). *J Am Chem Soc.* 124, 11001-11003.

Roberts, P.H., Zhou, X., Holmes, A.M., Ranson, H., Small, G., Hemingway, J., Ng, J.D., Chen, L., Meehan, E.J. (2001). Crystallization of agGST1-6, a recombinant glutathione S-transferase from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57, 134-136.

Robin, M.A., Prabu, S.K., Raza, H., Anandatheerthavarada, H.K., Avadhani, N.G. (2003). Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J Biol Chem.* 278, 18960–18970.

Ross, S. L., and Moses, R. E. (1978). Two actions of bleomycin on superhelical DNA. *Biochemistry*, 17, 581-586.

Rossjohn, J., Board P. G., Parker M. W., Wilce, M. (1996). A structurally derived consensus pattern for theta class glutathione transferases. *Protein Eng.* 9, 327–332.

Rossjohn, J., McKinsty, W. J., Oakley, A. J., Verger, D., Flanagan, J., Chelvanayagam, G., Tan, K.-L., Board, P. G, Parker, M. W. (1998). Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure.* 6, 309-322.

Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S.C., Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Parker, M.W. (1998). A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure.* 15, 721–734.

Rothenberg, M. L., Oza, A. M, Bigelow, R.H., Berlin, J. D., Marshall, J.L., Ramanathan, R.K., Hart, L. L., Gupta, S., Garay, C.A., Burger, B.G., Le, Bail N, Haller, D.G. (2003). Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J. Clin. Oncol.* 21, 2059-2069.

Rónyai, L., Ivanyos, G., Szabó, R. (1999). *Algorithms.* Typotex, Budapest. 349p.

Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229-1234.

Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., Allen, R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol.* 15, 988-991.

Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. (2008). The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology.* 59. 143–166.

Rozen S. and Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- Rubinson, K. A., Ladner, J. E., Tordova, M., Gilliland, G. L. (2000). Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography, *Acta Cryst. D* 56, 996-1001.
- Sahaf, B., Heydari, K., Herzenberg, L.A. (2003). Lymphocyte surface thiol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 4001-4005.
- Samanta, S. K., Singh, O. V., Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* 20, 243–248.
- Santos, P.M., Mignogna, G., Heipieper, H.J., Zennaro, E. (2002). Occurrence and properties of glutathione S-transferases in phenol-degrading *Pseudomonas* strains. *Res Microbiol.* 153, 89–98.
- Satoh, K. (1995). The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations. *Carcinogenesis* 16, 869–874.
- Schellman, J. A. (1955). Stability of hydrogen bonded peptide structures in aqueous solution. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.* 29, 230–259.
- Scholtz, R., Wackett L. P., Egli C., Cook A. M., Leisinger T.. (1988). Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium. *J. Bacteriol.* 170, 5698–5704.
- Schröder, P. (2001). The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. In: White PJ, Hammond JP, Eds. 155-183.
- Seeger, M., Zielinski, M., Timmis, K.N., Hofer, B. (1999). Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3614-3621.
- Sheehan, D., and J. P. Casey. (1993). Microbial glutathione S-transferases. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B, 1–6.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360, 1–16.

Shimabukuro, R.H., Frear, D.S., Swanson, H.R., Walsh, W.C. (1971). Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. *Plant Physiol.* 47, 10-14.

Shimaoka, T., Yokota, A., Miyake, C. (2000). Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 41, 1110-1118.

Shishido, T. (1981). Glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2951–2953.

Shokeer, A., Larsson, A.K., Mannervik, B. (2005). Residue 234 in glutathione transferase T1-1 plays a pivotal role in the catalytic activity and the selectivity against alternative substrates. *Biochem J.* 388, 387-392.

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27, 916-921.

Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G., Olin, B., Mannervik, B., Jones, A.T. (1993). Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* 232, 192–212.

Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Stenberg, G., Board, P.G., Mannervik, B. (1991). Mutation of an evolutionarily conserved tyrosine residue in the active site of a human class Alpha glutathione transferase. *FEBS Lett.* 293, 153-155.

Sipser, M. (1997). *Introduction to the Theory of Computation*. PWS Publishing Company.

Skopelitou, K., Labrou, N.E. (2010). A new colorimetric assay for glutathione transferase-catalyzed halogen ion release for high-throughput screening. *Anal Biochem.* 405, 201-206.

Smith, E.F., Townsend, C.O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.

Solomonoff, Ray. (1960). *A Preliminary Report on a General Theory of Inductive Inference*. Report V-131, Zator Co., Cambridge, Ma.

Solomonoff, Ray. (1964). A Formal Theory of Inductive Inference, Information and Control. Part I, 7, 1-22, and Part II, 7, 224-254.

Stenberg, G., Board, P. G., Mannervik, B. (1991). FEBS Lett. 293, 153-155.

Simons, P.C., Vander Jagt, D.L. (1981). Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography. Methods Enzymol. 77, 235-237.

Stoehlmacher, J., Park, D.J., Zhang, W., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Yu, M.C., Lenz, H.J. (2002). Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 94, 936-942.

Stourman, N.V., Rose, J.H., Vuilleumier, S., Armstrong, R.N. (2003). Catalytic mechanism of dichloromethane dehalogenase from *Methylophilus* sp. strain DM11. Biochemistry. 42, 11048–11056.

Stourman, N.V., Branch, M.C., Schaab, M.R., Harp, J.M., Ladner, J.E., Armstrong, R.N. (2011). Structure and function of YghU, a nu-class glutathione transferase related to YfcG from *Escherichia coli*. Biochemistry. 50, 1274-1281.

Sugiyama, A., and Sekiya, J. (2005). Homogluthathione confers tolerance to acifluorfen in transgenic tobacco plants expressing soybean homogluthathione synthetase. Plant Cell Physiol. 46, 1428-1432.

Sun, Y., and Oberley, L.W. (1989). The inhibition of catalase by glutathione. Free Radic Biol 7, 595-602.

Sundberg, A., Appelkvist, E.L., Dallner, G., Nilsson, R. (1994). Glutathione transferases in the urine: Sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans. Environ Health Perspect. 102: 293-296.

Sutherland, T.D., Horne, I., Weir, K.M., Coppin, C.W., Williams, M.R., Selleck, M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., (2004). Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 817-821.

Sweeney, C., Nazar-Stewart, V., Stapleton, P.L., Eaton, D.L., Vaughan, T.L. (2003). Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 12, 527-533.

- Takezawa, T., Terauchi, R., Itou, M., Kanzaki, H., Nakamura, I. (2001). JP2001231574.
- Takesawa, T., Ito, M., Kanzaki, H., Kameya, N., Nakamura, I. (2002). Overexpressing of [zeta] glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Mol. Breed.* 9, 93–101.
- Takimoto, C.H., Calvo, E. (2008). Principles of Oncologic Pharmacotherapy in Pazdur, R., Wagman, L.D., Camphausen, K.A., Hoskins, W.J. (Eds) *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 11 ed.
- Tan, K. H., Meyer, D. J., Gillies, N., Ketterer, B. (1988). *Biochem. J.* 254, 841-845.
- Tao, H. and Cornish, V.W. (2002). Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 858–864.
- Tappel, A.L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxidase. IN Fleischer S and Packer L (eds). *Methods in Enzymology.* 52, 506-513.
- Tew, K.D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Perspectives in Cancer Research. Cancer Res.* 54, 4313–4320.
- Tew, K.D., Taylor, D.M. (1977). Studies with cyclophosphamide labeled with phosphorus-32: nucleic acid alkylation and its effect on DNA synthesis in rat tumor and normal tissues. *J Natl Cancer Inst.* 58, 1413-1419.
- Thom, R., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Laphorn, A.J. (2001). The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J Mol Biol.* 308, 949-62.
- Thom, R., Cummins, I., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Laphorn, A.J. (2002). Structure of a Tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry.* 41, 7008-7020.
- Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7, 909–915.

- Thompson, L.C., Ladner, J.E., Codreanu, S.G., Harp, J., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N. (2007). 2-Hydroxychromene-2-carboxylic acid isomerase: a kappa class glutathione transferase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*. 46, 6710–6722.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Thorén, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschöld C., Pettersson P.L., Samuelsson B., Hebert H., Hamberg M., Morgenstern R., Jakobsson P. (2003). Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J. Biol. Chem.* 278, 22199–22209.
- Thornalley, P.J. (2003a). Glyoxalase I—structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1343–1348.
- Thornalley, P.J. (2003b). Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1372–1377.
- Thornton, J.M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J. Molec. Biol.* 151, 261–287.
- Timmis, K.N. and Pieper, D.H. (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 17, 200–204.
- Tipton, K.F., Dixon, H.B.F. (1979). Effects of pH on Enzymes. In *Methods in Enzymology* (D.L. Purich ed.), Academic Press, New York. 63, 183-234.
- Tirona, R.G. and Pang, K.S. (1999). Bimolecular glutathione conjugation kinetics of ethacrynic acid in rat liver: In vitro and perfusion studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 290, 1230–1241.
- Tocheva, E.I., Fortin, P.D., Eltis, L.D., Murphy, M.E. (2006). Structures of ternary complexes of BphK, a bacterial glutathione S-transferase that reductively dechlorinates polychlorinated biphenyl metabolites. *J Biol Chem.* 281, 30933-30940.
- Toung, Y-P.S. and Tu, C-P.D. (1992). *Drosophila* glutathione S-transferases have sequence homology to the stringent starvation protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 355-360.

- Townsend, D.M. and Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22, 7369–7375.
- Travensolo, R.F., Garcia, W., Muniz, J.R., Caruso, C.S., Lemos, E.G., Carrilho, E., Araujo, A.P. (2008). Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione S-transferase from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif*. 59, 153–160.
- Travis, L.B, Curtis, R.E., Bennett, W.P., Hankey, B.F., Travis, W.D., Boice, J.D. (1995). Lung cancer after Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst*. 87, 1324-1327.
- Tsuchiya, T., Takesawa, T., Kanzaki, H., Nakamura, I. (2004). Genomic structure and differential expression of two tandem-arranged GSTZ genes in rice. *Gene*. 335, 141-149.
- Urade, Y., Eguchi, Y., Eguchi, N., Kijima, Y., Matsuura, Y., Oda, H., Seiki, K., Hayaishi, O. (1999). Secretion of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) from human heart to plasma during coronary circulation. *Adv Exp Med Biol*. 469, 49-54.
- Urano, J., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N., Ushimaru, T. (2000). Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett*. 466, 107-111.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. & Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 252, 38–53.
- Van Bladeren, P.J., Breimer, D.D., Rotteveel-Smijs, G.M., de Jong, R.A., Buijs, W., van der Gen, A., Mohn, G.R. (1980). The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2-dibromoethane. *Biochem Pharmacol*. 29, 2975-2982.
- Vander Jagt, D.L. (1993). Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism. *Biochem Soc Trans*. 21, 522-527.
- Vega, M. C., Walsh, S. B., Mantle, T. J., Coll, M. (1998). The three-dimensional structure of Cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1. Carboxymethylation dramatically decreases the affinity for glutathione and is associated with a loss of electron density in the alphaB-310B region. *J. Biol. Chem*. 273, 2844-2850.

Vuilleumier, S. (1997). Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol.* 179, 1431–1441.

Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M.C., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J., Cruveiller, S., Dossat, C., Gillett, W., Gruffaz, C., Haugen, E., Hourcade, E., Levy, R., Mangenot, S., Muller, E., Nadalig, T., Pagni, M., Penny, C., Peyraud, R., Robinson, D.G., Roche, D., Rouy, Z., Saenampechek, C., Salvignol, G., Vallenet, D., Wu, Z., Marx, C.J., Vorholt, J.A., Olson, M.V., Kaul, R., Weissenbach, J., Médigue, C., Lidstrom, M.E. (2009). *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS One.* 4, 5584.

Vuilleumier, S., Ivos, N., Dean, M., Leisinger, T. (2001). Sequence variation in dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferases. *Microbiology.* 147, 611–619.

Vuilleumier, S., and T. Leisinger. (1996). Protein engineering studies of dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase from *Methylophilus sp. strain DM11*. Ser12 but not Tyr6 is required for enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* 239, 410–417.

Vuilleumier, S. & Pagni, M. (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 58, 138-146.

Wallwork, J.C., Brenchley, P., McCarthy, J., Allan, J.D., Moss, D., Ward, A.M., Holzel, A., Williams, R.F., McFarlane, H. (1974). Some aspects of immunity in patients with cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 18, 303-320.

Walsh, C. (1979). *Enzymatic reaction mechanisms.* San Francisco: W. H. Freeman.

Wang, Y., Lau, P.C., Button, D.K. (1996). A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol.* 62, 2169–2173.

Wang, R. W., Newton, D. J., Pickett, C. B., Lu, A. Y. H. (1992). Site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase YaYa: Functional studies of histidine, cysteine, and tryptophan mutants *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 86-91.

Watabe, T. and Watabe, T. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 278-284.

Weston, D.P., and Lydy M. J. (2010). Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environmental Science and Technology* (Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley: American Chemical Society). 44, 1833–1840.

Wikteliu, E., Stenberg, G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem J.* 406, 115–123.

Wilce, M.C.J, Parker, M.W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. A comprehensive review of mammalian GSTs. *Biochim Biophys Acta*, 1205, 1-18.

Wilce, M. C. J., Board P. G., Feil S. C., Parker M. W. (1995). Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *Embo J.* 14, 2133–2143.

Wilson, S.R., Zucker, P.A., Huang, R.R.C., Spector, A. (1989). Development of synthetic compounds with glutathione glutathione transferases. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5936–5939.

Wolf, A.V., Brown, M.G., Prentiss, P.G. (1985). *Handbook of Chemistry and Physics* (Weast, R.C., Astle, M.J., & Beyer, W.H., Eds.), D-219-D-269. CRC Press, Inc., Boca Raton, F.L.

Wongsantichon, J., Robinson, R.C., Ketterman, A.J. (2010). Structural contributions of delta class glutathione transferase active-site residues to catalysis. *Biochem J.* 428, 25-32.

Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida, N.F. Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee, D. Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutuyavin, T., Levy, R., Li, M.-J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.-Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.-F., Gordon, M.P., Olson, M.V., Nester, E.W. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science.* 294, 2317-2323.

Wootton, J. C., Federhen, S. (1993). Statistics of local complexity in amino acid sequences and sequence databases. *Computers in Chemistry.* 17, 149-163.

- Wu S., Acevedo J.P., Reetz M.T. (2010). Induced allostery in the directed evolution of an enantioselective Baeyer–Villiger monooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 2775–2780.
- Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z.M., Liu, J., Ye, Y.F., Duan, X.J. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation.* 16, 393–402.
- Xie, G., Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* 64, 25-43.
- Xun, L., Topp, E., Orser, C.S. (1992). Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium sp.* *J Bacteriol.* 174, 8003-8007.
- Yan, F., Yang, W.K., Li, X.Y., Lin, T.T., Lun, Y.N., Lin, F., Lv, S.W., Yan, G.L., Liu, J.Q., Shen, J.C. (2008). A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1780, 869–872.
- Yan, H., Gui, Z., Wang, B. (2011). A study on effects of glutathione s-transferase from silkworm on CCL4-induced mouse liver injury. *Pak J Pharm Sci.* 24, 1-5.
- Yang, H., Carr P.D., Yu S., McLoughlin, J.W., Liu, I., Horne, X., Qiu, C.M.J., Jeffries, Russell R.J. Oakeshott, J.G., Ollis, D.L. (2003). Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.* 16, 135–145.
- Yu, T., Li, Y.S., Chen, X.F., Hu, J., Chang, X., Zhu, Y.G. (2003). Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. *J Plant Physiol.* 160, 1305-1311.
- Yang, J.Y., and Yang, M.Q. (2008). Predicting protein disorder by analyzing amino acid sequence. *BMC Genomics,* 9 Suppl 2:S8.
- Yasgar, A., Foley, T.L., Jadhav, A., Inglese, J., Burkart, M.D., Simeonov, A. (2010). A strategy to discover inhibitors of *Bacillus subtilis* surfactin-type phosphopantetheinyl transferase. *Molecular Biosystems* 6, 365–375.
- Yoshiga, S., Soya, Y. (2005). JP 2005198525.

Young, R.C., Chabner, B.A., Hubbard, S.P., Fisher, R.I., Bender, R.A., Anderson, T., Simon, R.M., Canellos, G.P., DeVita, V.T. Jr. (1978). Advanced ovarian adenocarcinoma. A prospective clinical trial of melphalan (L-PAM) versus combination chemotherapy. *N Engl J Med.* 299, 1261–1266.

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2001). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 89.

Yu, M. (1977). *A Course in Mathematical Logic*, Springer-Verlag.

Zablotowicz, R.M., Hoagland, R.E., Locke, M.A., Hickey, W.J. (1995). Glutathione S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61, 1054–1060.

Zeng, Q.Y., Lu, H., Wang, X.R. (2005). Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). *Biochimie.* 87, 445–455.

Zhang, S.Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., Nakajima, T., (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology.* 248, 136-141.

Zhang, Y., Wade, K.L., Prestera, T., Talalay, P. (1996). Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation assay with 1,2-benzenedithiol. *Anal. Biochem.* 239, 160–167.

Zwelling, L.A., Michaels, S., Schwartz, H., Dobson, P.P., Kohn, K.W. (1981). DNA cross-linking as an indicator of sensitivity and resistance of mouse L1210 leukemia to cis-diamminedichloroplatinum(II) and L-phenylalanine mustard. *Cancer Res.* 41, 640-649.

Γιαννακουδάκης, Δ. Α. (1993). Εφαρμογές φυσικοχημείας - Θεσσαλονίκη : Ζήτη.

Δημόπουλος, Β. (1998). Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα. Σελ. 104.

Καπετανάκης, Ε. (2005). Μέσα & Μέθοδοι Αντιμετώπισης Φυτοπαρασίτων. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο. Σελ. 176.

Κλώνης, Ι. (1997). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη.

Κλώνης, Ι. (2007). Ενζυμολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Μουμτζής Ι. Α. - Σαζού Δ. Π.. (1997). Ηλεκτροχημεία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσ/κη.

