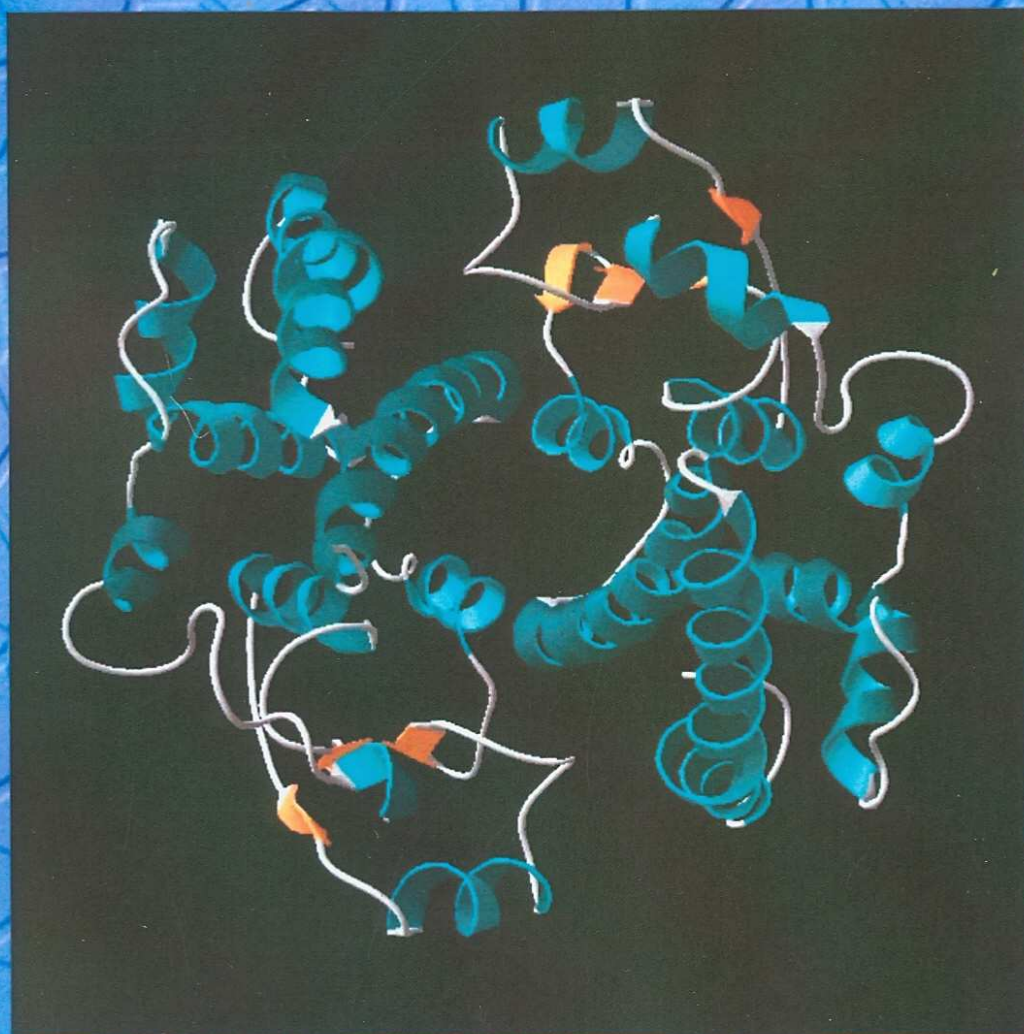


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Μελέτη της αλληλεπίδρασης του  
ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου από  
Schistosoma japonica με ξενοβιοτικές ενώσεις*



Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του  
μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης  
του  
ΜΙΧΑΗΛ Ι. ΠΛΑΤΗ

ΑΘΗΝΑ 2010

“Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενζύμου S- μεταφοράση του γλουταθείου από Schistosoma japonica με ξενοβιοτικές ενώσεις”

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης του  
Πλατή Ι. Μιχαήλ

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στις 02/09/2006, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η πενταμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

**Πενταμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:**

Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α., Λάμπρου Νικόλαος	(Επιβλέπων)
Καθηγητής Γ.Π.Α., Κλώνης Ιωάννης	(Μέλος)
Καθηγητής Γ.Π.Α., Κατινάκης Παναγιώτης	(Μέλος)
Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Π.Α., Κίντζιος Σπυρίδων	(Μέλος)
Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Μηλιώνη Δήμητρα	(Μέλος)

Ερευνητική Εργασία στα Πλαίσια του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης  
του

ΠΛΑΤΗ Ι. ΜΙΧΑΗΛ

---

## *Ευχαριστίες*

Αισθάνομαι βαθύτατα την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα:

- Τον επιβλέποντα, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ν. Λάμπρου, για την αμέριστη συμπαράσταση, την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, για τις εύστοχες υποδείξεις του, καθώς και τον ενθουσιασμό και το σεβασμό που μου εμφύσησε για τη φύση τόσο της συγκεκριμένης μελέτης, όσο και του ευρύτερου πεδίου της επιστήμης μας.
- Τον Καθηγητή κ. Ι. Κλώνη για την εμπιστοσύνη και για τις ουσιαστικές και πολύτιμες συμβουλές του κατά την διεξαγωγή αυτής της μελέτης.
- Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής: Καθηγητή κ. Π. Κατινάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο και την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Δ. Μηλιώνη για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις τους.
- Επιπλέον το Δρ. κ. Δ. Πλατή, την υποψήφια Δρ. κα. Ε. Αξαρχή και την Δρ. Γ. Κοτζιά για τις πολύτιμες υποδείξεις και τη συνεργασία τους.
- Τέλος την οικογένεια μου για την ηθική συμπαράσταση.

---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	5
<b>1.1.Γενικά για τις S-μεταφοράσες του γλουταθείου (GSTs)</b> .....	7
<b>1.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs</b> .....	8
<b>1.3. Ο λειτουργικός ρόλος των GSTs</b> .....	12
1.3.1. Αποτοξίνωση ξενοβιοτικών μέσω συμπλοκοποίησης με το GSH.....	13
1.3.2. Προστασία των κυττάρων από οξειδωτική καταπόνηση.....	15
1.3.3. Κατάλυση αντιδράσεων ισομερίωσης.....	17
1.3.4. Μη καταλυτικός ρόλος των GSTs ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης .....	19
1.3.5.Θεραπευτική σήμανση σε ασθένειες .....	20
<b>1.4. Περιγραφή της δομής των κυτταροπλασματικών GSTs</b> .....	22
1.4.1. Περιγραφή του διμερούς.....	27
1.4.2. Περιοχή δέσμευσης της GSH (G-θέση ).....	30
1.4.3.Περιοχή δέσμευσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος (H- θέση).....	32
1.4.4. Περιοχή αλληλεπίδρασης με δεσμευτή (L-θέση) .....	32
<b>1.5. Γενικά για το ένζυμο <i>SjGST</i></b> .....	33
1.5.1. GSTs από παρασιτικούς σκώληκες .....	33
1.5.2. GSTs από <i>Schistosoma</i> – <i>SjGST</i> .....	35
<b>1.6. Δομή του ενζύμου <i>SjGST</i></b> .....	36
1.6.1. Χαρακτηριστικά της δομής του ενζύμου <i>SjGST</i> χωρίς υπόστρωμα στο ενεργό του κέντρο.....	36
1.6.2. Χαρακτηριστικά της δομής του ενζύμου <i>SjGST</i> σε σύμπλοκο με το φάρμακο PZQ-L-θέση δέσμευσης .....	38
1.6.3. Σύγκριση της δομής του <i>SjGST</i> με τη δομή των GSTs από θηλαστικά .....	41
<b>1.7. Εφαρμογές του <i>SjGST</i></b> .....	41
<b>1.8. Σκοπός της παρούσας εργασίας</b> .....	44
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ</b> .....	45

---

2.1. Υλικά.....	47
2.1.1. Βιολογικά υλικά.....	47
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια και Kits.....	47
2.2. Εξοπλισμός .....	47
<b>3.ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>49</b>
3.1. Ετερόλογος έκφραση σε <i>E. coli</i> του ενζύμου GST από <i>Schistosoma japonica</i> .....	51
3.2. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα .....	51
3.3. Λύσιμο κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.....	51
3.4. Διαπίδυση .....	52
3.5. Καθαρισμός του ενζύμου <i>SjGST</i> μέσω χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας ως προσροφητή S-εξυλ-GSH.....	52
3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	53
3.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	53
3.7.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS) .....	54
3.7.2. Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.....	55
3.7.3. Βαφή με Coomassie Brilliant blue R-250.....	55
3.8. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST .....	56
3.9. Προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις....	56
3.10. Αδρανοποίηση του ενζύμου από τη χρωστική VBAR .....	57
3.11. Κινητική ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής του ενζύμου GST .....	57
3.12. Προσδιορισμός του IC <sub>50</sub> της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις .....	58
3.13. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	58
<b>4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>59</b>
4.1. Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου <i>SjGST</i> σε <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	61
4.2. Καθαρισμός του ενζύμου <i>SjGST</i> , μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή S-εξυλ-GSH .....	61
4.3. Μελέτη της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις .....	62

---

4.4. Μελέτη της αναστολής του ενζύμου από τη VBAR .....	74
4.5. Επίδραση των ξενοβιοτικών ενώσεων DDT, dieldrin, endosulphan, CB3GA, ορθο/παρα/μετα-σουλφονυλ-παραγώγων, VBAR και βρωμαμινικό οξύ επί της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου SjGST ...	80
4.6. Κινητική ανάλυση του ενζύμου SjGST με υπό της επίδρασης των ξενοβιοτικών endosulphan και CB3GA .....	85
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	89
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

---

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABS, O.D.	Απορρόφηση
APS	Υπερθειικό αμμώνιο
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CB3GA	Cibacron blue 3GA
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
D/min	Διαφορά απορρόφησης ανά λεπτό
ddH <sub>2</sub> O	Δις απιονισμένο νερό
DDT	1,1,1-trichloro-2, 2-bis ( <i>p</i> -chlorophenyl) ethane
DOC	Δεοξυχολικό νάτριο
GSH	Γλουταθείο
GST	S-μεταφοράση του γλουταθείου
IC <sub>50</sub>	Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή
IPTG	Ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο
k <sub>m</sub>	Σταθερά Michaelis
k <sub>i</sub>	Σταθερά διάστασης αναστολέα ή σταθερά αναστολής
k <sub>s</sub>	Σταθερά διάστασης ενζύμου-αναστολέα με υπόστρωμα
LB	Θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani Medium
pH	-log[H <sup>+</sup> ]
PZQ	Praziquantel
rpm	Στροφές ανά λεπτό
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
SjGST	GST ένζυμο από το <i>Schistosoma japonica</i>
TCA	Τριχλωροξικό οξύ
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
Tris	Τρις (υδροξυμέθυλ)αμινομεθάνιο
unit (u)	Ενζυμική μονάδα
VBAR	Vilmafix blue A-R
V <sub>max</sub>	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι S-μεταφοράσες του γλουταθείου (GSTs) είναι ένζυμα που συμμετέχουν στην αδρανοποίηση τοξικών ενδογενών ή εξωγενών ενώσεων (ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις), μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικού συμπλόκου μεταξύ αυτών και του γλουταθείου (GSH). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το ένζυμο GST από *Schistosoma japonica* (SjGST). Εξετάστηκε κατά πόσο η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου GST επηρεάζεται από 57 διαφορετικές ξενοβιοτικές ενώσεις σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Διαπιστώθηκε ότι επέρχεται μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας από την ομάδα των ενώσεων, οι οποίες ανήκουν στις τριαζινο-χρωστικές. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η επίδραση δομικών θραυσμάτων της τριαζινο-χρωστικής cibacron blue 3GA (CB3GA). Διαπιστώθηκε ότι όλο το μόριο της χρωστικής CB3GA, είναι αναγκαίο για ισχυρή αναστολή. Τέλος πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των δύο επικρατέστερων ενώσεων, ως προς το γλουταθείο (GSH) και το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), και διαπιστώθηκε ότι η CB3GA αλληλεπιδρά στο ίδιο ενζυμικό κέντρο που επιδρά και το CDNB.



---

## **ABSTRACT**

Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) comprise a large family of glutathione binding enzymes that catalyse the conjugation of GSH with a variety of hydrophobic electrophiles through the formation of a thioether bond. The enzymes offer protection against toxic xenobiotics and by-products of oxidative metabolism. In addition to their catalytic activities plant GSTs are also involved in the response to different biotic and abiotic stresses, and can be specifically induced in response to a variety of stimuli, such as pathogens and chemicals. In the present study, the binding of non-substrate xenobiotic compounds (herbicides, insecticides and triazine dyes) to GST from *Schistosoma japonica* (*Sj*GST) was investigated by employing kinetic inhibition studies and affinity labeling experiments. Triazine dyes behave as strong inhibitors. In particular, the reactive dichlorotriazine dye Vilmafix blue A-R (VBAR) acts as affinity label for *Sj*GST and binds specifically and irreversibly to the enzyme ( $k_3 = 0,036 \text{ min}^{-1}$  και  $K_D = 1,05 \text{ }\mu\text{M}$ ) at a distinct site near the substrate binding site. The monochlorotriazine dye Cibacron blue 3GA (CB3GA) behaves as a reversible inhibitor ( $\text{IC}_{50} = 0,057 \text{ }\mu\text{M}$ ). Kinetic inhibition studies, as well as  $\text{IC}_{50}$  determinations were employed to assess the ability of the structural fragments of the triazine dye Cibacron blue 3GA to act as affinity ligands for *Sj*GST.

---

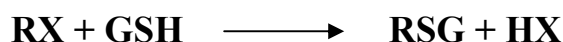
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### 1.1. Γενικά για τις S-μεταφοράσες του γλουταθείου (GSTs).

Οι S-μεταφοράσες του γλουταθείου (GSTs) (EC 2.5.1.18) είναι ευρέως διαδεδομένα πολυλειτουργικά ένζυμα που βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς και συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου αδρανοποιώντας εξωγενείς ή ενδογενείς τοξικούς παράγοντες (Hayes *et al.*, 2005). Παρακάτω παρουσιάζεται το γενικό σχήμα αντίδρασης που καταλύουν. Συγκεκριμένα καταλύουν την νουκλεόφιλη προσβολή του τριπεπτιδίου γλουταθείου (GSH) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (R) διάφορων ενώσεων, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Armstrong, 1997), όπου R μπορεί να είναι μια αλειφατική, αρωματική, ετεροκυκλική ή εποξειδική ομάδα και το X ποικιλία ανόργανων και οργανικών ομάδων :



Το προϊόν της αντίδρασης RSG είναι περισσότερο υδρόφιλο, μη τοξικό, και αποβάλλεται ευκολότερα από το κύτταρο (Frona, 2006). Οι GSTs είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ένζυμα για φαρμακολογικούς και τοξικολογικούς λόγους καθόσον αποτελούν στόχους για αντιασθματικές και κατά των όγκων θεραπείες (Evans *et al.*, 1991, Matsushita *et al.*, 1998, Jakobsson *et al.*, 1999, Ruscoe *et al.*, 2001) καθώς επίσης μεταβολίζουν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες κατά του καρκίνου, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, καρκινογόνους παράγοντες και παραπροϊόντα οξειδωτικού στρες (Hayes *et al.*, 2005). Η υπερέκφραση των GSTs σε κυτταρικούς όγκους θηλαστικών «ενοχοποιείται» ως αντίδραση των οργανισμών αυτών σε διάφορους αντικαρκινικούς παράγοντες και χημικά καρκινογόνα (Hayes & Pulford, 1995). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα έκφρασης GSTs έχουν συσχετιστεί με αντοχή σε εντομοκτόνα και με επιλεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα (Ranson *et al.*, 2001, Edwards & Dixon, 2004).

Σε μικροοργανισμούς, φυτά, έντομα, ψάρια και θηλαστικά η έκφραση των GSTs ρυθμίζεται θετικά με την έκθεση σε προοξειδωτικά (Desikan *et al.*, 2001, Kobayashi *et al.*, 2002, Veal *et al.*, 2002, Allocati *et al.*, 2003, An & Blackwell, 2003, Leiers *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003). Επίσης αύξηση της έκφρασης των GSTs παρατηρείται σε ζώα τα οποία υφίστανται παρατεταμένη αδράνεια ή λήθαργο σε σύγκρισή με την έκφραση των εν λόγω ενζύμων σε κατάσταση εγρήγορσης των ζώων αυτών (Grundy & Storey, 1998). Παρόμοιο

---

φαινόμενο αύξησης της έκφρασης των GSTs παρατηρείται κατά τη μετάβαση του κοινού φρύνου *Bufo bufo* από το υδατικό περιβάλλον στην στεριά (Amicarelli *et al.*, 2004). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η επαγωγή της έκφρασης των GSTs είναι μια εξελικτικά συντηρημένη αντίδραση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες (Hayes *et al.*, 2005).

## 1.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία των GSTs.

Οι GSTs χωρίζονται σε τρεις οικογένειες: τις κυτταροπλασματικές GSTs, που είναι αυτές που πρωτοανακαλύφθηκαν και έχουν μελετηθεί περισσότερο, τις μεμβρανικές μικροσωμικές GSTs και τις GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (Armstrong, 1997).

Μέλη της υπεροικογένεια των κυτταροπλασματικών GSTs βρίσκονται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς και αποτελούν την πιο «άφθονη» κατηγορία GSTs. Για παράδειγμα στον άνθρωπο και σε άλλα είδη θηλαστικών έχουν βρεθεί 15-20 διαφορετικά γονίδια κυτταροπλασματικών GSTs, στα φυτά 40–60, στα βακτήρια 10–15, και πάνω από 10 στα έντομα (Frona, 2006). Ένα φυλογενετικό δένδρο των σχέσεων μεταξύ των γονιδίων GSTs για τρεις διαφορετικούς οργανισμούς (σκώληκα, μύγα, ποντίκι) παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1.

Με βάση την αμινοξική τους ακολουθία τα κυτταροπλασματικά GSTs μπορούν να διαχωριστούν σε ένα αριθμό τάξεων (Mannervik & Danielson, 1988). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί οι επτά ακόλουθες τάξεις:  $\alpha$  (A, alpha),  $\mu$  (M, mu),  $\pi$  (P, pi),  $\sigma$  (sigma),  $\theta$  (T, theta),  $\zeta$  (Z, zeta), και  $\omega$  (O, omega) (Hayes & Pulford, 1995, Armstrong, 1997, Board *et al.*, 1997, Dixon *et al.*, 1998, Hayes & McLellan, 1999, Board *et al.*, 2000, Sheehan *et al.*, 2001, Hayes *et al.*, 2005). Επιπλέον τάξεις GSTs εκτός από τα θηλαστικά έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς. Για παράδειγμα στα έντομα έχουν βρεθεί οι τάξεις:  $\delta$  (D, delta) και  $\epsilon$  (epsilon) (Alias & [Clark](#), 2007), στα φυτά οι τάξεις:  $\phi$  (F, phi),  $\tau$  (T, tau),  $\lambda$  (L, lambda), πρωτεΐνες με δράση δεϋδροασκορβική αναγωγή (DHAR) (Dixon *et al.*, 2002a, 2002b) και στα βακτήρια οι τάξεις:  $\beta$  (beta) (Rossjohn *et al.*, 1998, Allocati *et al.*, 2003) και  $\chi$  (chi) (Wiktelius & Stenberg, 2007). Στα φυτά εκτός από των τάξεων που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν βρεθεί και εκπρόσωποι των τάξεων  $\theta$  και  $\zeta$  (Droog, 1997, Edwards *et al.*, 2000, Dixon *et al.*, 2002b) που βρίσκονται και στα ζώα αλλά και στους μύκητες. Τα μέλη

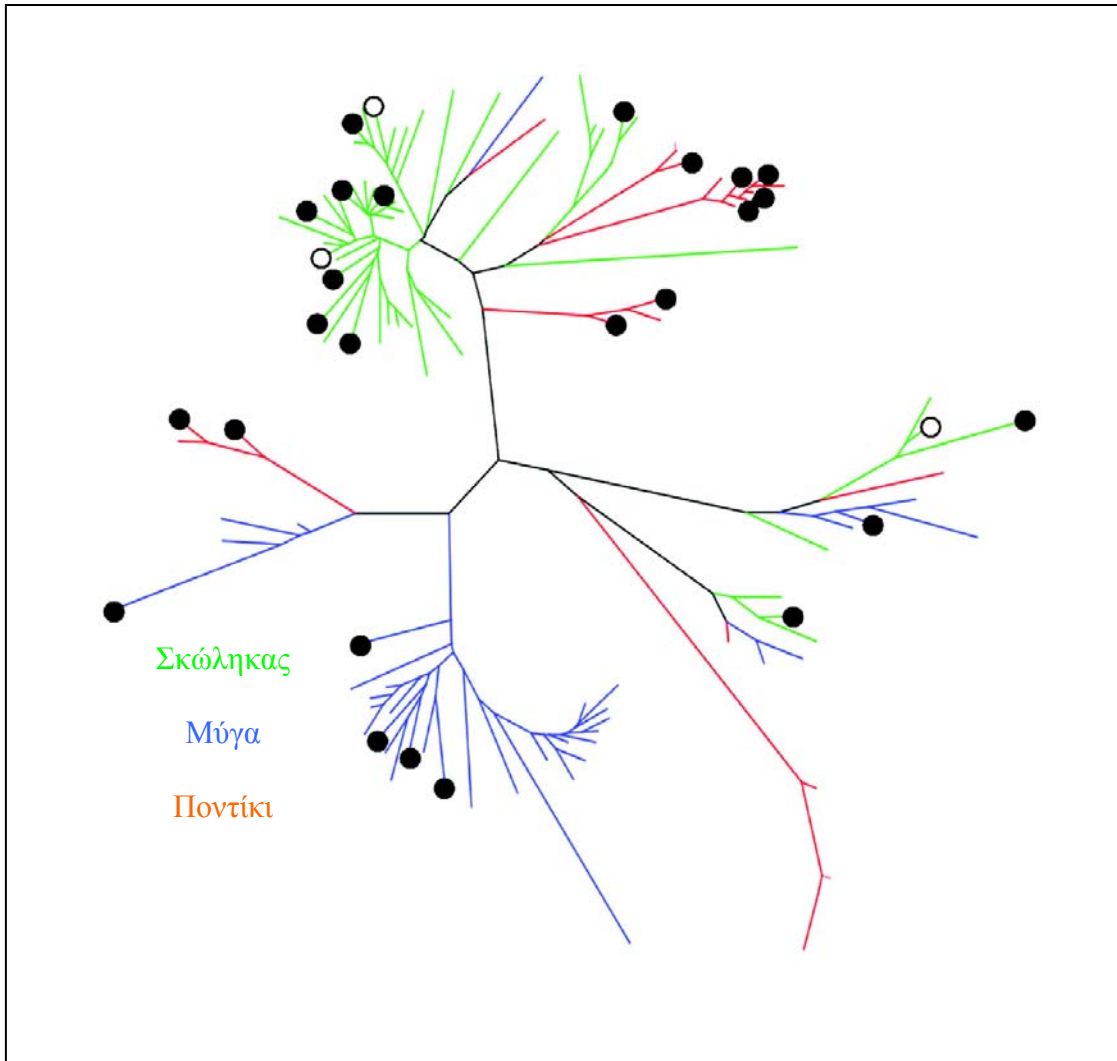
---

της υπεροικογένειας των κυτταροπλασματικών GSTs συνεχώς αυξάνονται λόγω της συνεχούς αύξησης των γενετικών πληροφοριών. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες η κ (K, kappa) τάξη των GSTs που θεωρούνταν μέλος των κυτταροπλασματικών GSTs αποτελεί μια ξεχωριστή υπεροικογένεια (Jowsey *et al.*, 2003, Ladner *et al.*, 2004, Robinson *et al.*, 2004) μιτοχονδριακών ενζύμων.

Οι κυτταροπλασματικές GSTs παίρνουν μέρος στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών και αποτελούν το 2% των διαλυτών πρωτεϊνών του κυττάρου (Scalla & Roulet, 2002). Γενικά μέλη της ίδιας τάξης παρουσιάζουν μεγαλύτερη από 40-50% ομολογία ως προς τη νουκλεοτιδική τους ακολουθία αλλά μικρότερη από περίπου 25-30% ομολογία με GSTs άλλων τάξεων (Hayes & Pulford, 1995). Ένα φυλογενετικό δένδρο των σχέσεων μεταξύ των τάξεων των GSTs παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2.

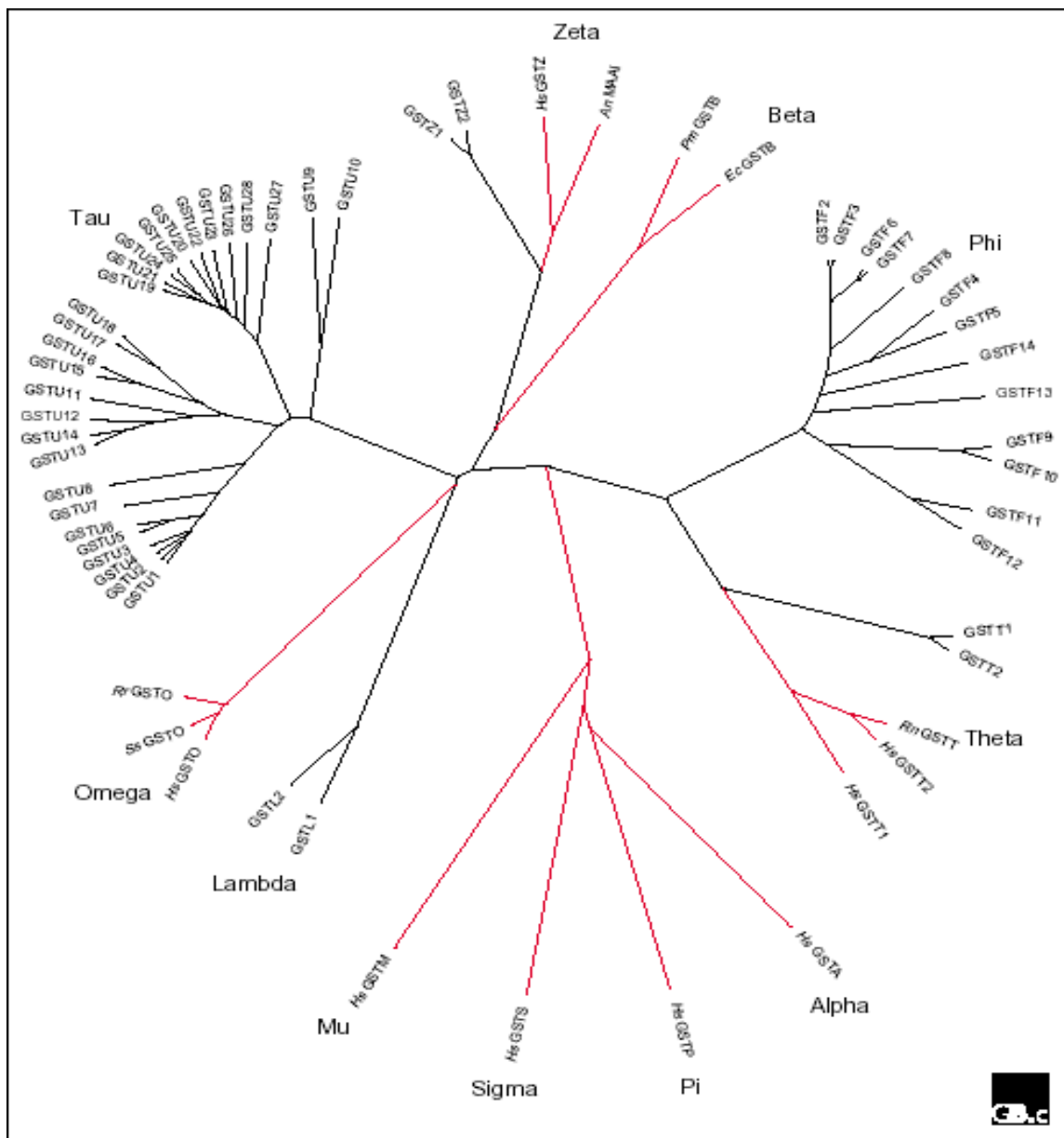
Παρά την υψηλή διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ των διαφόρων τάξεων των GSTs, η γενική δομή των ενζύμων είναι σχεδόν η ίδια. Έχουν μοριακό βάρος περίπου 50 kDa και αποτελούνται από δυο παρόμοιες υπομονάδες ( $\approx 25$  kDa). Κάθε υπομονάδα περιέχει ένα ανεξάρτητο ενεργό κέντρο με ευδιάκριτες περιοχές δέσμευσης του γλουταθείου και του ξενοβιοτικού υποστρώματος (Marx, 1996). Λεπτομέρειες για τη δομή τους θα αναφερθούν σε επόμενη παράγραφο.

Η δεύτερη οικογένεια, οι μεμβρανικές μικροσωμικές GSTs δεν εμφανίζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GSTs. Ωστόσο, εμφανίζουν ομοιότητα με άλλες δυο μεμβρανικές GSTs, την συνθάση του λευκοτριενίου C<sub>4</sub> και την μικροσωμική GST II όπου και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν το ίδιο μέγεθος, περίπου την ίδια αλληλουχία και συνδέονται με την μεμβράνη (Weinander *et al.*, 1996, Jakobsson *et al.*, 1996). Δομικά τα ένζυμα αυτά είναι τριμερή με τρεις ανεξάρτητες μη-αλληλεπιδρούσες ενεργές περιοχές (Sun & Morgenstem, 1997). Οι μικροσωμικές GSTs έχουν αναφερθεί εκτός από θηλαστικά και στα φυτά και στα ζώα (Diesperger & Sandermann, 1979, Zettl *et al.* 1994). Αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης έχει αποτελέσει η μεμβρανική μικροσωμική GST1 (MGST1) από αρουραίο λόγω της δράσης της στην κυτταρική άμυνα έναντι αντικαρκινικών φαρμάκων (Zhang & Lou, 2003).



**Σχήμα 1.1.** Φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει τις οικογένειες γονιδίων GSTs από σκώληκες, μύγες και ποντίκια. Τα γονίδια από κάθε είδος έχουν διαφορετικό χρώμα (πράσινο για το σκώληκα, μπλε για τη μύγα και κόκκινο για το ποντίκι) και τα σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια παρουσιάζονται με κλειστούς ή ανοιχτούς κύκλους (McElwee *et al.*, 2007).

Η τρίτη οικογένεια, οι GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (Arca *et al.*, 1988, Arca *et al.*, 1990), είναι ασυνήθη GSTs, ανήκουν στην κατηγορία των μεταλλοενζύμων και δεν εμφανίζουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GSTs καθώς καταλύουν και διαφορετικές κατηγορίες χημικών αντιδράσεων (Arca *et al.*, 1990). Η πρωτοταγής δομή τους δεν σχετίζεται με καμία από τις παραπάνω οικογένειες και επίσης δεν καταλύουν την προσθήκη του γλουταθείου σε συνήθη ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Arca *et al.*, 1990).



**Σχήμα 1.2.** Φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει την ποικιλία των κυτταροπλασματικών GSTs και την σχέση μεταξύ των διαφόρων τάξεων. Όλες οι GSTs που αναγνωρίστηκαν από το φυτό *Arabidopsis* εμφανίζονται με μαύρο. Αντιπροσωπευτικές GSTs από άλλες τάξεις και οργανισμούς εμφανίζονται με κόκκινο και τα ονόματά τους προτάσσονται με δύο γράμματα δηλώνοντας τον οργανισμό προέλευσης. *Hs*: *Homo sapiens*, *Rr*: *Rattus rattus*, *Rn*: *Rattus norvegicus*, *Ss*: *Sus scrofa*, *An*: *Aspergillus nidulans*, *Pm*: *Proteus mirabilis*, *Ec*: *Escherichia coli*. Το μήκος των διακλαδώσεων αντιστοιχεί στην εκτιμώμενη εξελικτική απόσταση μεταξύ των πρωτεϊνικών αλληλουχιών (Dixon *et al.*, 2002a).

---

Σύμφωνα με το σύστημα της ονοματολογίας που καθιερώθηκε το 1992 αρχικά για τις ανθρώπινες GSTs (Mannervik *et al.*, 1992) και αργότερα επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει και προκαρυωτικούς και άλλους οργανισμούς (Hayes & Pulford, 1995) μπροστά από το πρόθεμα 'GST' προτάσσονται δύο γράμματα που προσδιορίζουν το γένος και το είδος του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο (*At* για *Arabidopsis thaliana*, *Sj* για *Schistosoma japonica*, *Zm* για *Zea mays*, *Lc* για *Lucilia cuprina* κ.τ.λ.) ενώ για άλλους οργανισμούς το είδος τους καθορίζεται από ένα γράμμα (h για τον άνθρωπο, m για το ποντίκι) (Edwards *et al.*, 2000, Chelvanayagam *et al.*, 2001). Το πρόθεμα 'GST' ακολουθεί ένα κεφαλαίο γράμμα που υποδεικνύει την τάξη στην οποία ανήκει το ένζυμο (A, M, P, K, T για την α, μ, π, κ, θ τάξη αντίστοιχα) και κατόπιν η «σύσταση» των υπομονάδων του ενζύμου ή ο τύπος του ισοενζύμου προσδιορίζεται από αραβικούς αριθμούς (1, 2, 3...). Για παράδειγμα ένα ομοδιμερές της μ τάξης με τύπου 1 υπομονάδες χαρακτηρίζεται ως M1-1 και το ετεροδιμερές της α τάξης με τύπου 1 και 2 υπομονάδες προσδιορίζεται ως A1-2. Οι διαφορετικοί αλληλόμορφοι των ισοενζύμων περιγράφονται ένα μικρό γράμμα (a, b, c ...) που ακολουθεί τον τύπο των υπομονάδων (Armstrong, 1997).

### 1.3. Ο λειτουργικός ρόλος των GSTs.

Οι GSTs, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι πολυλειτουργικά ένζυμα με θεμελιώδη ρόλους στην κυτταρική αποτοξίνωση ενός μεγάλου εύρους εξωγενών και ενδογενών παραγόντων (π.χ. καρκινογόνα χημικά, περιβαλλοντικά απόβλητα, αντικαρκινικές ουσίες, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, μικροβιακά αντιβιοτικά) (Frona, 2006). Παρόλο που αρκετά από τα ένζυμα αυτά δεν έχουν δράση μεταφοράς αποκαλούνται ακόμα GSTs προφανώς διότι τα πρώτα ένζυμα αυτής της κατηγορίας που ανακαλύφθηκαν ήταν μεταφοράσες.

Στα ζώα και στα φυτά, οι GSTs είναι τα βασικότερα ένζυμα της φάσης II του μηχανισμού αποτοξίνωσης του μεταβολισμού (Coleman *et al.*, 1997). Επιπλέον οι GSTs μπορούν να λειτουργήσουν ως υπεροξειδάσες, ισομεράσες και θειομεταφοράσες (Jensson *et al.*, 1986, Bartling *et al.*, 1993, Fernandez-Canon & Penalva, 1998, Board *et al.*, 2000) ή να έχουν μη καταλυτική δράση ως πρωτεΐνες μεταφοράς και μεταγωγής σημάτων (Listowsky, 1993, Marrs, 1996, Mueller *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2003, Axarli *et al.*, 2004, Adler *et al.*, 1999, Loyall *et al.*, 2000, Cho *et al.*, 2001). Συνεπώς ο αρχικός χαρακτηρισμός των GSTs ως ένζυμα αποτοξίνωσης έχει αλλάξει και οι ρόλοι τους επεκτείνονται στους μηχανισμούς του μεταβολισμού για αντιμετώπισης του στρες, στην βιοσύνθεση της προσταγλαδίνης και του



---

λευκοτριενίου (Tsuchida *et al.*, 1987, Kanaoka *et al.*, 1997, Jakobsson *et al.*, 1999) και στον καταβολισμό αρωματικών αμινοξέων (Fernandez-Canon & Penalva, 1998, Thom *et al.*, 2001). Λεπτομέρειες για ορισμένους από τους πολλαπλούς ρόλους των GSTs ενζύμων αναλύονται παρακάτω.

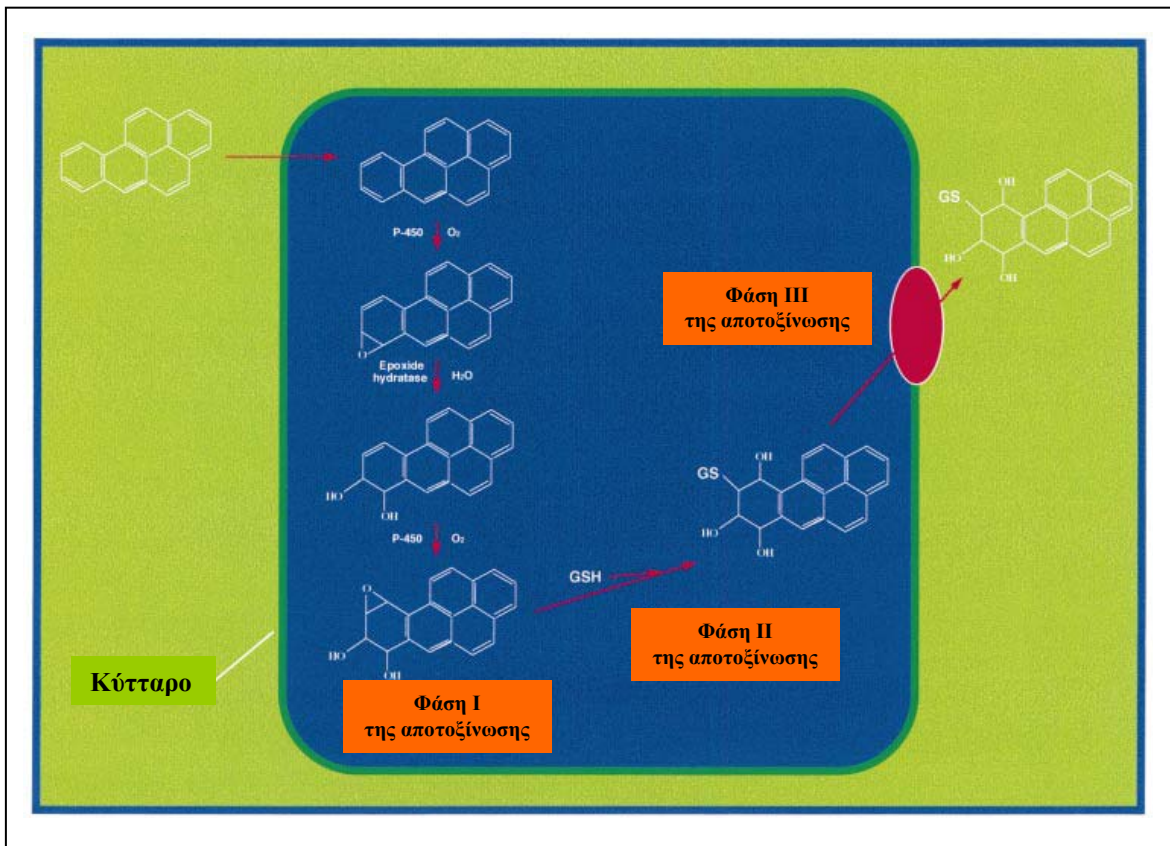
### **1.3.1. Αποτοξίνωση ξενοβιοτικών μέσω συμπλοκοποίησης με το GSH.**

Όπως προείπαμε η ικανότητα των GSTs να αδρανοποιούν τοξικούς ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες αποτελεί τον ρόλο "κλειδί" αυτών των ενζύμων και για αυτό αποτελούν ένζυμα της φάσης II του μηχανισμού αποτοξίνωσης του μεταβολισμού.

Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι συνεχώς εκτεθειμένοι σε αντιδιατροφικούς, συχνά τοξικούς, παράγοντες. Αυτοί οι ξενοβιοτικοί παράγοντες-υποστρώματα μπορούν να δράσουν δυσμενώς σε έναν οργανισμό, προκαλώντας τοξικά και πολλές φορές καρκινογόνα αποτελέσματα (Ames *et al.*, 1990). Ο κίνδυνος από τέτοια υποστρώματα έχει αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της εκτεταμένης δημιουργίας και διακίνησης στο περιβάλλον καινούργιων χημικών από τους ίδιους τους ανθρώπους αλλά προϋπήρχε από τότε που πρωτοδημιουργήθηκε η ζωή. Φυσικά παραγόμενα τοξικά υποστρώματα περιλαμβάνουν φυτικές και μυκητιακές τοξίνες (π.χ φυτικές φαινόλες και αφλατοξίνες) και ενεργές ρίζες οξυγόνου, όπως ρίζες υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Αυτή η ικανότητα για επιβίωση από ενδογενή ή εξωγενή υποστρώματα πιθανώς σηματοδοτεί μια βιολογική προσαρμογή η οποία είναι θεμελιώδης για την επιβίωση των οργανισμών (Hayes & Pulford, 1995, Hayes & McLellan, 1999). Μαζί με στρατηγικές όπως αυτές της απομόνωσης και της δέσμευσης ο καταλυτικός βιομετασχηματισμός είναι μια σημαντική βιοχημική προστασία έναντι των χημικών τοξικών υποστρωμάτων.

Τα κύτταρα παρουσιάζουν μια ευρεία ποικιλία από ένζυμα ικανά να μετασχηματίσουν ένα μεγάλο εύρος χημικών παραγόντων με διαφορετική δομή και λειτουργία. Η ενζυμική αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών έχει κατηγοριοποιηθεί σε τρεις διακριτές φάσεις (Kreuz *et al.*, 1996, Edwards & Dixon, 2000, Sheehan *et al.*, 2001, Frova, 2003). Οι φάσεις I και II περιλαμβάνουν την μετατροπή ενός λιπόφιλου, μη-πολικού ξενοβιοτικού σε ένα πιο υδατοδιαλυτό και λιγότερο τοξικό μεταβολίτη, ο οποίος μπορεί κατόπιν να καταστραφεί πιο εύκολα και αποτελεσματικά από το κύτταρο κατά την φάση III. Στο Σχήμα 1.3

παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ενζυμικής αποτοξίνωσης της τοξικής χημικής ουσίας βενζοπυρένιο (Sheehan *et al.*, 2001).



**Σχήμα 1.3.** Επισκόπηση της ενζυμικής αποτοξίνωσης. Αναλυτικότερα στο σχήμα παρουσιάζεται μια πιθανή μεταβολική «τύχη» του ξενοβιοτικού βενζοπυρένιο. Η ξενοβιοτική ουσία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, όπου γίνεται υπόστρωμα του κυτοχρώματος P450 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός εποξειδίου. Αυτό διαδοχικά γίνεται υπόστρωμα για την υδρατάση του εποξειδίου. Το προϊόν της αντίδρασης μπορεί πάλι να αντιδράσει με το κυτόχρωμα P450, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρκινογενούς εποξειδίου διόλης που αποτελεί παράγωγο του ξενοβιοτικού αυτού. Και τα δύο αυτά ένζυμα (κυτόχρωμα P450, υδρατάση του εποξειδίου) είναι μικροσωμικά και αποτελούν την φάση I της ενζυμικής αποτοξίνωσης. Οι GSTs είναι κυρίως κυτταροπλασματικά ένζυμα και παίρνουν μέρος στην φάση II της αποτοξίνωσης με το να καταλύουν την συμπλοκοποίηση της ξενοβιοτικής ουσίας με το GSH. Το σύμπλοκο GSH-ξενοβιοτικό που δημιουργείται διαχέεται διαμέσου της μεμβράνης με τη βοήθεια μιας διαμεμβρανικής ATP αντλίας, όπως η αντλία GS-X (Ishikawa, 1992). Αυτό συμβάλει στην μονόδρομη απέκκριση του ξενοβιοτικού από το κύτταρο, αφού το υδρόφιλο τμήμα της GSH εμποδίζει την επαναδιάχυση διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Στην τελική φάση το σύμπλοκο αυτό απεκκρίνεται από τα θηλαστικά ως μερκαπτουρικό οξύ (Sheehan *et al.*, 2001).

---

Κατά τη φάση I τα ξενοβιοτικά συνήθως περνάνε ελεύθερα μέσα από την πλασματική μεμβράνη. Μόλις περάσουν στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιείται η διαδικασία αποτοξίνωσης μέσω κυρίως της οξειδωσης του ξενοβιοτικού από οξειδοαναγωγάσες όπως τα ένζυμα κυτοχρωμάτων P450 (Guengerich, 1990). Ο ρόλος των ενζύμων αυτών είναι η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων πάνω στα ξενοβιοτικά υποστρώματα. Αυτή η οικογένεια των μικροσωμικών αυτών πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων, από τις οποίες η οξειδωση φαίνεται να είναι από τις πιο σημαντικές (Guengerich, 1990). Η ενεργοποίηση αυτή δεν είναι απαραίτητη για τη σύζευξη με το GSH που θα ακολουθήσει στην επόμενη φάση για ξενοβιοτικές ουσίες όπως είναι τα περισσότερα ζιζανιοκτόνα που έχουν ηλεκτρονιόφιλα κέντρα.

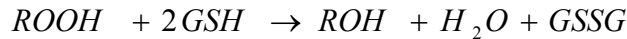
Τα ένζυμα της φάσης II καταλύουν την συμπλοκοποίηση ενεργών ξενοβιοτικών σε ένα πιο υδατοδιαλυτό υπόστρωμα, όπως UDP-γλουκουρονικό οξύ ή γλυκίνη. Η συμπλοκοποίηση με το GSH, η οποία καταλύεται από τις GSTs και τις ουριδυλοτρανσφεράσες, είναι η κύρια αντίδραση της φάσης II σε πολλά είδη. Στη φάση III, γίνεται ο διαχωρισμός και η απομόνωση των συμπλόκων που σχηματίστηκαν. Στα ζώα τα σύμπλοκα αυτά απομακρύνονται με απέκκριση ενώ στα φυτά συγκεντρώνονται στο χυμοτόπιο ή στον αποπλάστη μέσω των ATP-εξαρτώμενων μεμβρανικών αντλιών (GS-X pumps) (Coleman *et al.* 1997). Η απομάκρυνση των GS-συμπλόκων από το κυτόπλασμα (φάση III) έχει ουσιαστικό ρόλο στο μηχανισμό αποτοξίνωσης, γιατί διαφορετικά η αύξηση της συγκέντρωσής τους θα οδηγούσε σε παρεμπόδιση των GSTs και συνεπώς και της αποτοξίνωσης. Ιδίως στις περιπτώσεις που και τα GS-σύμπλοκα είναι τοξικά, η φάση III μπορεί να αποβεί κρίσιμη στην αποτοξίνωση.

### 1.3.2. Προστασία των κυττάρων από οξειδωτική καταπόνηση.

Μια άλλη λειτουργία των GSTs είναι η προστασία των κυττάρων από ζημιές που επιφέρει η οξειδωτική καταπόνηση. Πολλά ένζυμα GSTs έχουν βρεθεί να έχουν δράση υπεροξειδάσης του γλουταθείου (GPx) έναντι οργανικών υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό (Bartling *et al.*, 1993, Board *et al.*, 1997, Roxas *et al.*, 1997, Cummins *et al.*, 1999). Αυτά τα ένζυμα ανάγουν οργανικά υδροϋπεροξειδία λιπαρών οξέων, τα οποία απελευθερώνονται κατόπιν οξειδωτικής βλάβης

---

των μεμβρανών, στις αντίστοιχες μονοϋδρόξυ-αλκόολες, χρησιμοποιώντας γλουταθειώως δότη ηλεκτρονίου σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η δράση των GSTs ως GPxs ανήκει σε έναν από τους πιο σημαντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που υπάρχουν στα κύτταρα για την προστασία έναντι των υδροϋπεροξειδασών που ανήκουν στις ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) (Prohaska & Ganther, 1976). Παρόλο που μπορούν να ανάγουν ένα αρκετά μεγάλο εύρος οργανικών υδροϋπεροξειδασών δεν μπορούν να ανάγουν υδροϋπεροξειδάσες των φωσφολιπιδίων και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Mannervik, 1985, Eshdat *et al.*, 1997). Στους ανθρώπους οι GSTs με GPx δράση έναντι λιπαρών υδροϋπεροξειδίων ανήκουν κυρίως στην  $\alpha$  τάξη (Yang *et al.*, 2001). Επιπλέον GPx δράση έχει βρεθεί και σε θηλαστικά των  $\theta$  και  $\zeta$  τάξεων των GSTs. Επίσης αρκετές φυτικές GSTs έχει βρεθεί ότι έχουν επιπλέον δράση ως GPxs (Board *et al.*, 1997).

Πιο συγκεκριμένα για τα φυτικά GSTs έχουν βρεθεί μέλη της  $\varphi$  και  $\tau$  τάξης από δημητριακά (όπως το σόργο και το σιτάρι), μονοκότυλα ζιζάνια όπως το *Alopecurus myosuroides* (μαύρο γρασίδι-blackgrass), δικότυλα ζιζάνια όπως το *Arabidopsis thaliana* (Wagner *et al.*, 2002) που εκδηλώνουν σχετικά υψηλούς βαθμούς GPx δραστηριότητας έναντι της δράσης τους ως μεταφοράσες του γλουταθειού. Επίσης το ένζυμο AtGSTT1 της  $\theta$  τάξης από το φυτό *Arabidopsis* εκδηλώνει υψηλή GPx δραστηριότητα αλλά όχι δράση μεταφοράσης του GSH (Wagner *et al.*, 2002). Η υπερέκφραση ενός GST της  $\varphi$  τάξης από καπνό με υψηλή GPx δραστηριότητα προσέφερε αυξημένη ανθεκτικότητα στην καταπόνηση που δημιουργείται από τους παράγοντες καταπόνησης του άλατος και του κρύου (Roxas *et al.*, 1997). Η έκφραση του GST ενζύμου AmGSTF2 της  $\varphi$  τάξης από *Alopecurus myosuroides* με υψηλή GPx δραστηριότητα συσχετίζεται με ανθεκτικότητα σε οξειδωτική ζημιά που επιφέρεται από ζιζανιοκτόνο σε πληθυσμούς του φυτού μέσω της παρεμπόδισης της συσσώρευσης κυτταροτοξικών υδροϋπεροξειδίων (Cummins *et al.*, 1999). Οι φυτικές GSTs με GPx δραστηριότητα θεωρείται σήμερα ότι συμβάλουν στην άμυνα έναντι οξειδωτικών τραυμάτων κατά τη διάρκεια διαφόρων καταπονήσεων, που περιλαμβάνουν την οξειδωτική καταπόνηση, την επίθεση παθογόνων, χειρισμό με ζιζανιοκτόνα και παρατεταμένη και σοβαρή έκθεση σε μια σειρά από αβιοτικές καταπονήσεις (Allocati *et al.*, 2003, Moons, 2005).

---

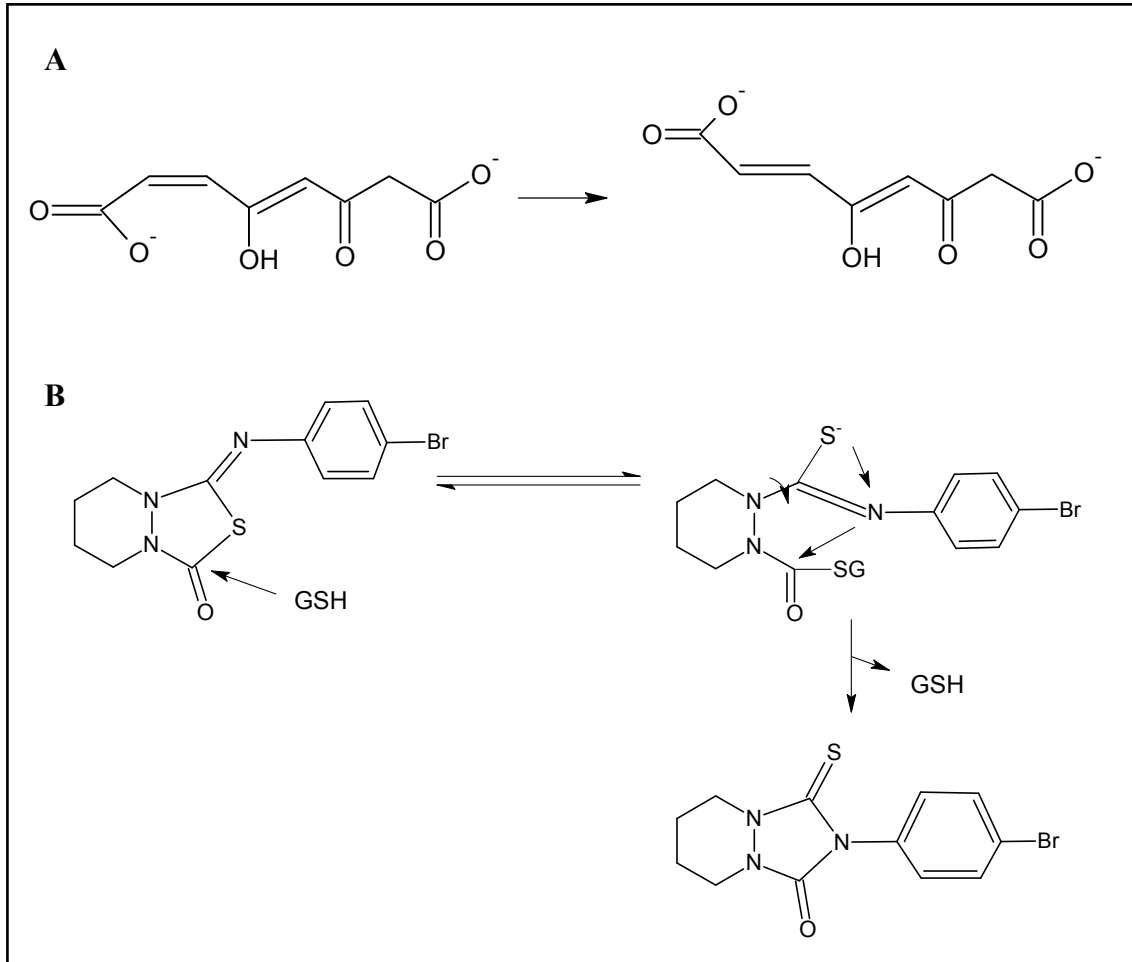
### 1.3.3. Κατάλυση αντιδράσεων ισομερίωσης.

Οι GSTs παίζουν ουσιαστικό ρόλο και στην ισομερίωση συγκεκριμένων μεταβολιτών καταλύοντας αντιδράσεις ισομερίωσης διαφόρων τύπων. Ο περισσότερο μελετημένος τύπος είναι η μετατροπή *cis* διαμόρφωσης διπλού δεσμού σε *trans* διαμόρφωση (Boylard & Chasseaud, 1967, Keen *et al.*, 1976) όπως στην περίπτωση του ισομερισμού του διαιθυλ-μηλεϋνικού σε διαιθυλ-φουμαρικό.

Ένα άλλο είδος GST εξαρτώμενων αντιδράσεων είναι οι αντιδράσεις ισομερίωσης της θέσης διπλών δεσμών. Η πιο μελετημένη τέτοια αντίδραση είναι η μετατροπή του  $\Delta^5$ -3-κετοστεροειδούς σε  $\Delta^4$ -3-κετοστεροειδές (Keen *et al.*, 1976). Γενικότερα τα ένζυμα GSTs μέσω των αντιδράσεων αυτών φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών. Όλες οι στεροειδής ορμόνες των ανθρώπων προέρχονται από χοληστερόλη και τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί ότι οι GSTs εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τεστοστερόνης και προγεστερόνης (Johansson & Mannervik, 2001, 2002). Η καταλυτική ικανότητα ισομερισμού των GSTs έχει διαπιστωθεί και κατά τη βιοσύνθεση των προσταγλαδίνων (PGs). Η προσταγλαδίνη H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) προέρχεται από την προσταγλαδίνη D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) μέσω αντίδρασης ισομερίωσης που καταλύεται *in vivo* από GST της  $\sigma$  τάξης και GSTs της  $\alpha$  τάξης *in vitro* (Atkins *et al.*, 1993). Επίσης έχει προσδιοριστεί ότι GSTs της  $\zeta$  τάξης τόσο από άνθρωπο και *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Canon & Penalva, 1998) όσο και από το φυτό *Arabidopsis* (Thom *et al.*, 2001) δρουν ως μαλεϋλακετοξικές ισομεράσες και καταλύουν ένα στάδιο «κλειδί» στο μονοπάτι καταβολισμού της τυροσίνης, το οποίο συνδέεται με πολλές δυσλειτουργίες (Blackburn *et al.*, 2000, 2001). Το ένζυμο αυτό καταλύει την GSH-εξαρτώμενη *cis-trans* ισομερίωση του μαλεϋλακετοξικού προς φουμαρυλακετοξικό (Σχήμα 1.4.A) και της μαλεϋλακετόνης προς φουμαρυλακετόνη.

Στα φυτά, η απόδειξη της λειτουργίας των GSTs ως ισομεράσες έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση των φυτοφαρμάκων του τύπου των θειαδιαζολιδινών. Τα τελευταία ενεργοποιούνται με καταλύσιμη από GST ισομερίωση τους σε τριαζολιδίνες, που είναι ισχυροί παρεμποδιστές της οξειδάσης του πρωτοπορφυρινογόνου (Jablonkai *et al.*, 1997). Ο μηχανισμός της ισομερίωσης πιθανώς πραγματοποιείται με τη νουκλεόφιλη προσβολή του GSH στην καρβονυλική ομάδα, μια διαδικασία που πραγματοποιείται με τη δράση των GSTs ενζύμων (Σχήμα 1.4.B). Επειδή ανοίγει ο δακτύλιος μπορεί πια να περιστραφεί ο N-

C δεσμός με τη μεταφορά του διπλού δεσμού C=N στην ομάδα C-S. Τέλος το άτομο του N προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα έτσι ώστε να ξανασηματιστεί ο δακτύλιος απομακρύνοντας έτσι το GSH (Jablonkai *et al*, 1997).



**Σχήμα 1.4.** **A.** Η κατάλυση της *cis-trans* ισομερίωσης του μαλεϋλακετοξικού προς φουμαρυλακετοξικό από GST ζ τάξης. **B.** Η κατάλυση ισομερίωσης του πρόδρομου φυτοφαρμάκου θειαδιαζολιδίνη προς το φυτοτοξικό φυτοφαρμάκο τριαζολιδίνη από GST, δείχνοντας τον προτεινόμενο μηχανισμό της αντίδρασης και το σχηματισμό του ενδιάμεσου GSH συμπλόκου.

#### 1.3.4. Μη καταλυτικός ρόλος των GSTs ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης.

Οι GSTs μπορούν να λειτουργούν ως πρωτεΐνες μεταφοράς-δέσμευσης ή *ligandin* πρωτεΐνες για ενδογενή και εξωγενή, συχνά βιοδραστικά υποστρώματα (Sheehan *et*

---

*al.*, 2001). Ο μη καταλυτικός αυτός ρόλος των GSTs τους επιτρέπει να δεσμεύουν αντιστρεπτά ένας σημαντικό αριθμό υδρόφοβων υποστρωμάτων όπως η αίμη, στεροειδή, ορμόνες, χολικά άλατα, τα αζωχρώματα, η χολερυθρίνη, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματά τους και να συνεισφέρουν στην ενδοκυτταρική μεταφορά ή στην απομόνωση τους (Listowski *et al.*, 1988, Hayes & Pulford, 1995, Hayes *et al.*, 2005). Οι ουσίες αυτές δεσμεύονται σε κέντρα δέσμευσης του πρωτεϊνικού μορίου που έχουν ονομαστεί L-θέση δέσμευσης ή ligandin sites (Tipping *et al.*, 1976, Hayes & Pulford, 1995). Στην παράγραφο 1.4.4 θα αναλυθεί περαιτέρω η L-θέση δέσμευσης όπως έχει προσδιορισθεί σε GSTs δομές.

Ιστορικά οι L-θέσεις δέσμευσης αποτελούν χαρακτηριστικό της  $\alpha$  τάξης των GSTs ενζύμων που οδήγησε αρχικά στο να αποκαλούνται οι GSTs της  $\alpha$  τάξης «δεσμευτές» (ligandin) (Hayes & Pulford, 1995). Ρόλοι GSTs ενζύμων ως μεταφορείς έχουν εγκαθιδρυθεί για τις GSTs από θηλαστικά (Sheehan *et al.*, 2001) αλλά έχουν διαπιστωθεί και σε πολλές φυτικές GSTs (Bilang & Sturm, 1995). Οι φυτικές GSTs που λειτουργούν ως πρωτεΐνες πρόσδεσης ενδεχομένως παίζουν ρόλο στη διευκόλυνση της μεταφοράς δευτερογενή προϊόντων και τοξικών ενδιάμεσων του μεταβολισμού του φυτού (Dixon *et al.*, 2002a, Edwards *et al.*, 2000).

Πιο συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι στον αραβόσιτο και την πετούνια η απόθεση ανθοκυανίνων στο χυμοτόπιο γίνεται μέσω συγκεκριμένων GSTs (Alfenito *et al.*, 1998, Mueller *et al.*, 2000). Έχουν προσδιοριστεί και φυτικές GSTs που προσδέουν φυτοορμόνες όπως οι αυξίνες (Zettl *et al.*, 1994, Marrs, 1996) και οι κυτοκινίνες (Gonneau *et al.*, 1998) αν και με σχετικά χαμηλή καταλυτική ικανότητα. Για παράδειγμα το ένζυμο AtGSTF2 της  $\varphi$  τάξης από *Arabidopsis* βρέθηκε ότι προσδέεται στην αυξίνη ινδολ-3-οξεικό οξύ (IAA), στο συνθετικό αναστολέα μεταφοράς της αυξίνης 1-ναφθοφθαλαμικό οξύ (NPA) (Zettl *et al.*, 1994), στην τεχνητή αυξίνη 2-ναφθοξυξυϊκό οξύ (NAA) και με τα ενδογενή φλαβονοειδή κερκετίνης και της καιμπερόλης (Smith *et al.*, 2003). Δρώντας ως πρωτεΐνες πρόσδεσης φυτοορμονών οι φυτικές αυτές GSTs μπορεί να επιδρούν στη δραστηριότητα και την κατανομή αυτών των σημαντικών φυτικών ρυθμιστών ανάπτυξης που ελέγχουν πολλές πτυχές της ανάπτυξης των φυτών (Moons, 2005).

Η ακριβής λειτουργία και ο ρόλος που παίζουν οι L-θέσεις δέσμευσης δεν έχουν πλήρως διασαφηνισθεί (Sayed *et al.*, 2000, 2002, Le Trong *et al.*, 2002). Μια ενδεχόμενη υπόθεση

---

είναι ότι μέσω της δέσμευσης υποστρωμάτων στις θέσεις αυτές τα GSTs ένζυμα τα προστατεύουν από την *in vivo* οξειδωση τους (Axarli *et al.*, 2004). Επίσης κατά πάσα πιθανότητα οι GSTs με αυτήν τους την ιδιότητα παρεμποδίζουν την κυτταροξικότητα που θα συνέβαινε λόγω υπερβολικής συγκέντρωσης τέτοιων μορίων στις μεμβράνες ή στο εσωτερικό των κυττάρων (Marrs, 1996, Oakley *et al.*, 1999). Τέλος μια ακόμα υπόθεση είναι ότι μέσω αυτής της θέσης οι GSTs λειτουργούν ως μεταφορείς των υποστρωμάτων που προσδένονται εκεί έτσι ώστε να τα επιδώσουν σε εξειδικευμένους υποδοχείς ή σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα (Oakley *et al.*, 1999, Axarli *et al.*, 2004).

### 1.3.5. Θεραπευτική σήμανση σε ασθένειες.

Από μελέτες έχει δείχτεί πως τα λευκοτριένια και πεπτιδολευκοτριένια, όπως το LTD<sub>4</sub>, είναι σημαντικά στην παθογένεση ασθενειών όπως το βρογχικό άσθμα στον άνθρωπο (Rushmore & Pickett, 1993). Τα λευκοτριένια παράγονται από το αραχιδονικό οξύ, το οποίο απελευθερώνεται μέσα στο κύτταρο από τη θέση sn-2 των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων μέσω της φωσφολιπάσης του αραχιδονικού οξέος A<sub>2</sub> (Clark *et al.* 1991, Sharp *et al.*, 1991). Το απελευθερωμένο αραχιδονικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης δύο βημάτων μετατρέπεται στο ασταθές εποξειδίο, λευκοτριένιο A<sub>4</sub>. Στη συνέχεια το τελευταίο μεταβολίζεται περαιτέρω μέσω δύο πιθανών μονοπατιών. Είτε υδρολύεται από την κυτταροπλασματική υδρολάση LTA<sub>4</sub> παράγοντας το LTB<sub>4</sub> ή συμπλοκοποιείται με GSH, μέσω ενός δεσμευμένου σε μεμβράνη ενζύμου, για να σχηματιστεί έτσι το σουλφιδοπεπτίδιο λευκοτριένιο C<sub>4</sub>. Το ένζυμο που καταλύει τη συμπλοκοποίηση είναι η συνθετάση του λευκοτριενίου C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), ένα καινούριο ένζυμο της οικογένειας των GSTs (Piper, 1984, Ford-Hutchinson, 1990). Κατά το τελικό στάδιο το LTD<sub>4</sub> παράγεται από το LTC<sub>4</sub> με απομάκρυνση του L-γλουταμικού.

Από τα παραπάνω είναι φανερό πως εφόσον τα πεπτιδολευκοτριένια, όπως το LTD<sub>4</sub>, παίζουν σημαντικό ρόλο σε ασθένειες όπως το άσθμα, δύο νέες σημαντικές θεραπευτικές οδοί για την θεραπεία του μπορούν να είναι η παρεμπόδιση της σύνθεσης του LTC<sub>4</sub> ή η ανάπτυξη εξειδικευμένων ανταγωνιστών για τους LTD<sub>4</sub> υποδοχείς, (Rushmore & Pickett, 1993).

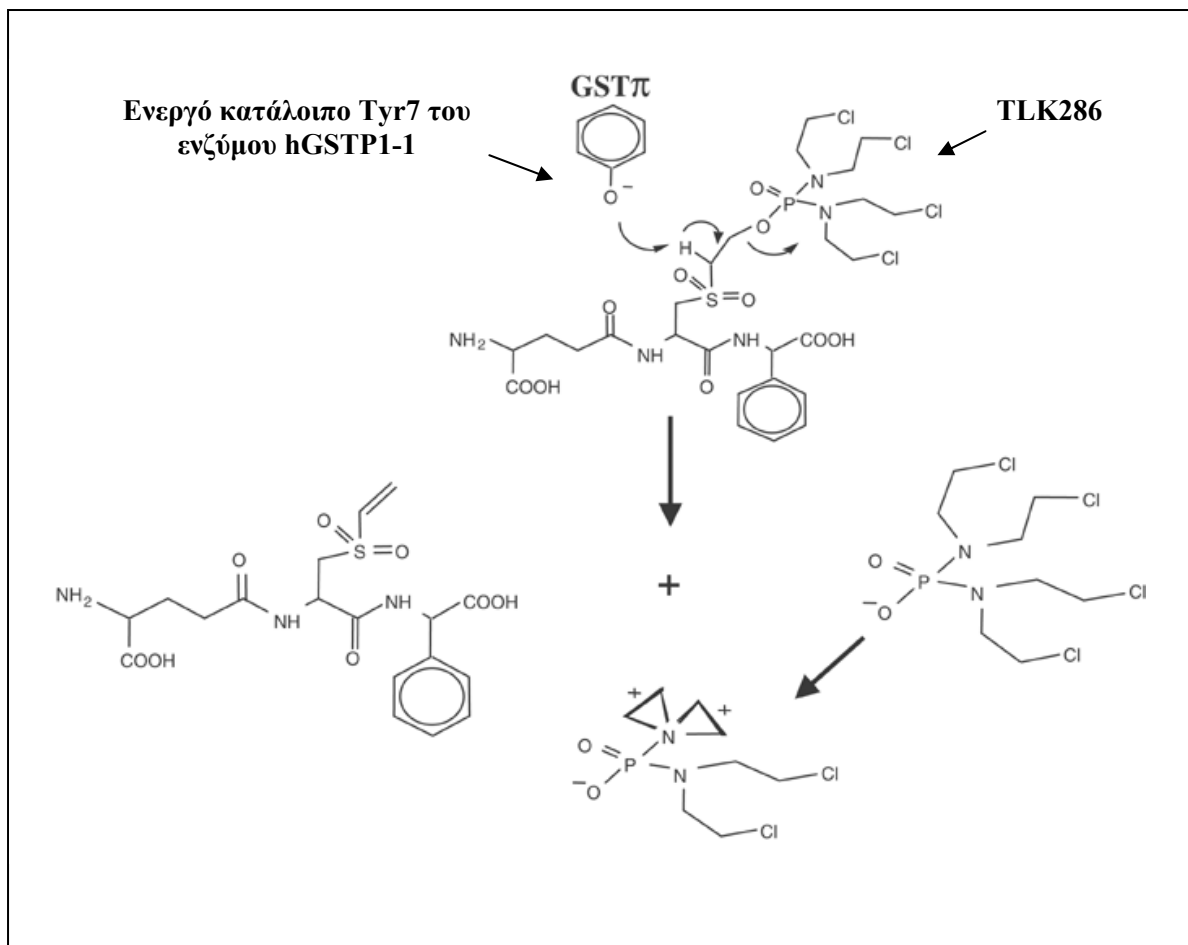
Οι GSTs όμως παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανθεκτικότητα έναντι των αντικαρκινικών φαρμάκων. Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι η αυξημένη και/ή η διαφορετική έκφραση ενός ή πολλών ισοενζύμων GSTs που εμφανίζεται σε



---

καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα κανονικά (Rushmor & Pickett, 1993). Ειδικότερα το ένζυμο GSTP1-1 υπερεκφράζεται πολύ συχνά ως αποτέλεσμα του αμυντικού μηχανισμού των καρκινικών κυττάρων έναντι στα αντικαρκινικά φάρμακα (π.χ. chlorambucil, melphalan, cisplatin). Για παράδειγμα, η αυξημένη αντοχή κυτταρικής σειράς από καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου μαστού στο φάρμακο adriamycin (Batist *et al.*, 1986) έχει αποδειχτεί ότι οφείλεται στην κατά 45-φορές αύξηση της έκφρασης του ισοενζύμου GSTP1-1. Για αυτό και το GSTP1-1 είναι ένας καλός μοριακός στόχος ενεργοποίησης προφαρμάκων. Επίσης οι Puchalski και Fahl (Puchalski & Fahl, 1990) εκφράζοντας τα ένζυμα GSTπ, GST 1-1 και GST 3-3 σε καλλιιεργούμενα κύτταρα θηλαστικού, απέδειξαν ότι η GST 1-1 παρείχε την υψηλότερη ανθεκτικότητα στα chlorambucil και melphalan (1,3-2,9 φορές), ενώ η GST 3-3 παρείχε υψηλότερη ανθεκτικότητα στο cisplatin (1,5-φορές).

Η ανάπτυξη των προφαρμάκων μέσω της χρήσης των GSTs έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην παραγωγή ενός σημαντικού αριθμού υποστρωμάτων (Findlay *et al.*, 2004). Ένα τέτοιο προφάρμακο που ενεργοποιείται από το ένζυμο hGSTP1-1 είναι το TLK286 (Townsend & Tew, 2003). Αυτό το προφάρμακο ενεργοποιείται μέσω μιας αντίδρασης β-απόσπασης μέσω της οποίας διασπάται το προφάρμακο σε ένα προϊόν που αποτελεί το τελικό αλκυλιωτικό μόριο και σε ένα ανάλογο GSH. 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 hGSTP1-1 (Σχήμα 1.5, Townsend & Tew, 2003).

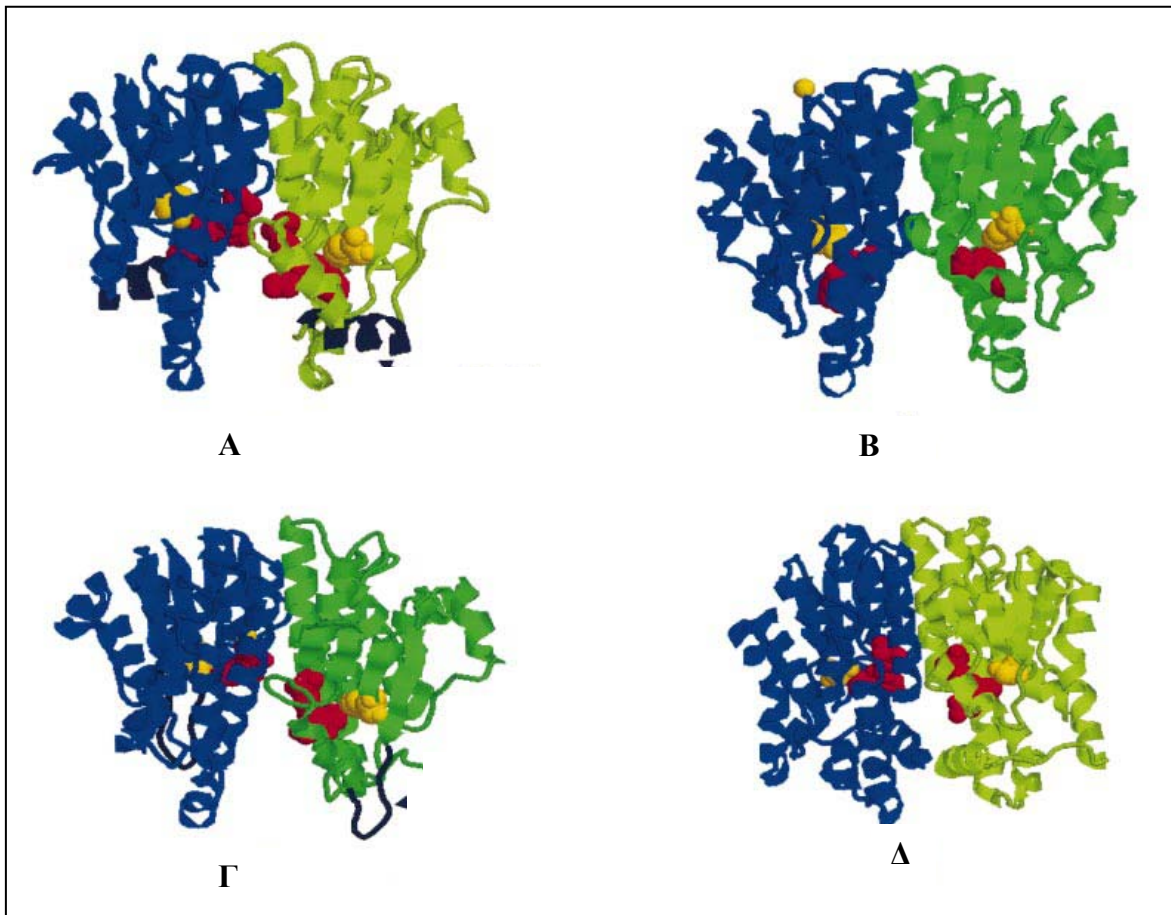


**Σχήμα 1.5.** Δομή του προφαρμάκου TLK286 και η ενεργοποίηση του από το ένζυμο hGSTP1-1. Το καταλυτικό αμινοξικό κατάλοιπο του hGSTP1-1 είναι η Tyr7 (Townsend & Tew, 2003).

#### 1.4. Περιγραφή της δομής των κυτταροπλασματικών GSTs.

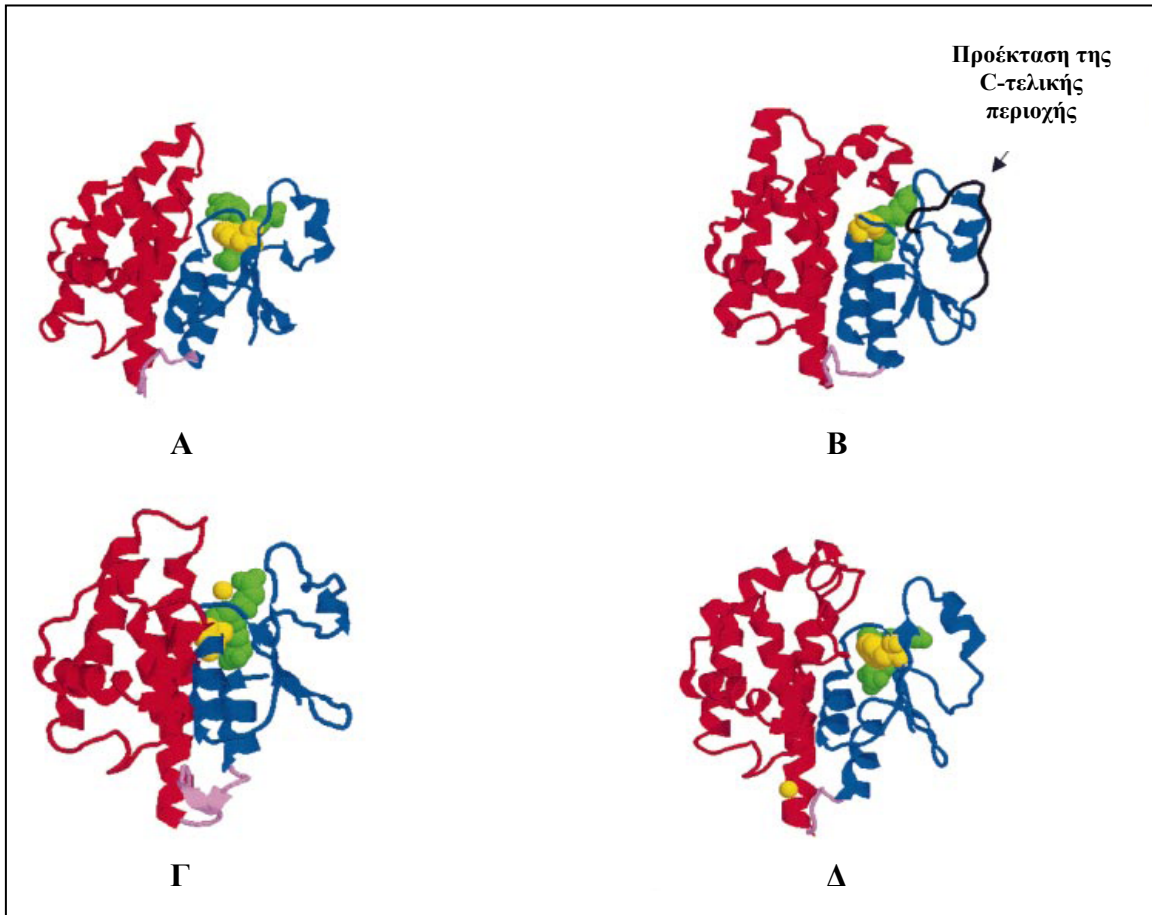
Οι περισσότερες κυτταροπλασματικές GSTs είναι ενζυμικά ενεργές ως διμερή, είτε ως ομοδιμερή είτε ως ετεροδιμερή, από υπομονάδες μεγέθους 23-30 kDa (μέγεθος πολυπεπτιδικής αλυσίδας περίπου 200-250 αμινοξέα). Οι τρισδιάστατες δομές πολυάριθμων GSTs όλων των κυτταροπλασματικών τάξεων (εκτός της κ τάξης) έχουν καθοριστεί μέσω κρυσταλλογραφία. Παρά την χαμηλή ομοιότητα στις αμινοξικές αλληλουχίες, οι τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές των GSTs είναι αξιοσημείωτα παρόμοιες. Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζονται οι τρισδιάστατες δομές κάποιων GSTs ενζύμων από όπου φαίνεται ότι υπάρχει μια εκπληκτικά συντηρημένη δομή. Ακολουθούν μια παρόμοια κανονική αναδίπλωση με κάθε υπομονάδα να αποτελείται από δύο ευδιάκριτες περιοχές όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.7 (Wilce & Parker, 1994, Sinning *et al.*, 1993,

Reinemer *et al.*, 1992a, Xiao *et al.*, 1996). Αυτές οι περιοχές είναι: (1) μια συντηρημένη αμινοτελική περιοχή (N-τελική δομική περιοχή ή περιοχή I, περίπου το ένα τρίτο της πρωτεΐνης) και (2) μια λιγότερο συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή (C-τελική δομική περιοχή ή περιοχή II, περιλαμβάνει τα δύο τρίτα της πρωτεΐνης), που περιέχει μόνο α-έλικες που ποικίλουν σε αριθμό (5-9), ανάλογα με το ένζυμο. Υπάρχει και μια τρίτη περιοχή που συνδέει τις N- και C- περιοχές (5-10 κατάλοιπα) (Dirig *et al.*, 1994) (Σχήμα 1.7).



**Σχήμα 1.6.** Παρουσίαση των τρισδιάστατων δομών των διμερών GSTs ενζύμων. Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως περιελίξεις και τα β-ελάσματα ως βέλη. Οι δύο υπομονάδες παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα (μπλε και πράσινο) και η διευθέτηση των δύο δομών έχει γίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διαφαίνεται η σχετικά παρόμοια διευθέτηση των δομών γύρω από το ενεργό κέντρο και η μεταξύ των δύο υπομονάδων σχισμή. Τα καταλυτικά σημαντικά αμινοξέα τυροσίνη και σερίνη παρουσιάζονται ως μπάλες χρώματος κίτρινου. Οι δεσμευτές με τους οποίους κρυσταλλοποιήθηκαν τα ένζυμα παρουσιάζονται ως σφαίρες χρώματος κόκκινου προσδιορίζοντας την περιοχή του ενεργού κέντρου. Οι αριθμοί καταχώρησης στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών

(Protein database bank-PDB) των δομών που παρουσιάζονται δίνονται στις παρενθέσεις: **A.** Ένζυμο  $\alpha$  τάξης από άνθρωπο (1GUH). **B.** Ένζυμο  $\pi$  τάξης από άνθρωπο (1GSS). **Γ.** Ένζυμο  $\mu$  τάξης από αρουραίο (6GST). **Δ.** Ένζυμο  $\theta$  τάξης από άνθρωπο (1LJR) (Sheehan *et al.*, 2001).

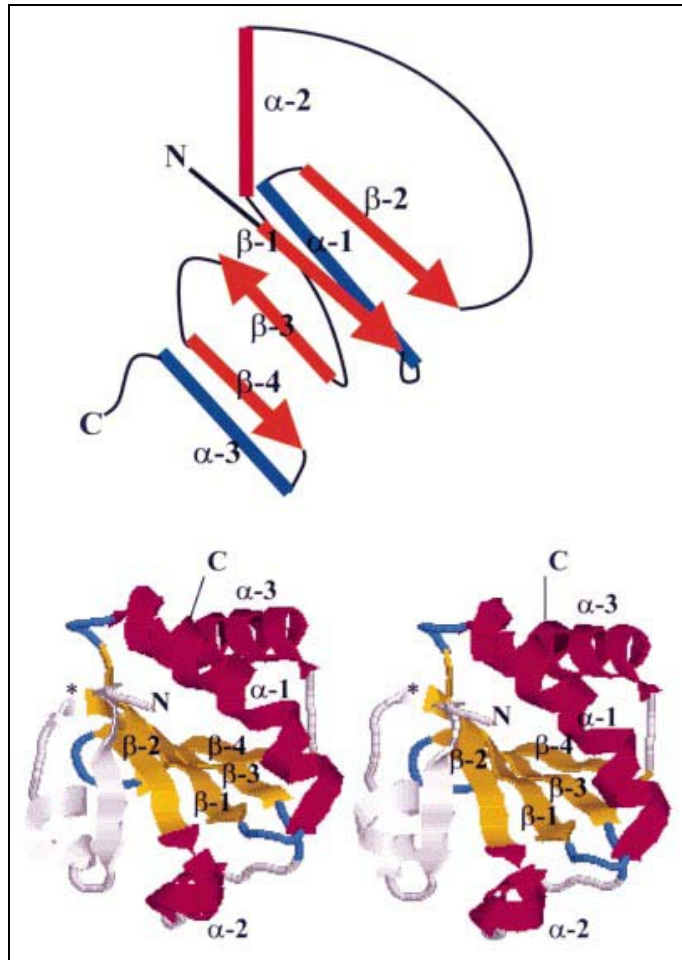


**Σχήμα 1.7.** Παρουσίαση των τρισδιάστατων δομών των μονομερών GST ενζύμων. Οι  $\alpha$ -έλικες παρουσιάζονται ως περιελίξεις και τα  $\beta$ -ελάσματα ως βέλη. Η C-τελική δομική περιοχή παρουσιάζεται με μπλε χρώμα ενώ η N-τελική δομική περιοχή με κόκκινο. Τα καταλυτικά σημαντικά αμινοξέα (τυροσίνη στις δομές A και Δ, κυστεΐνη στις δομές B και Γ) παρουσιάζονται ως σφαίρες χρώματος κίτρινου. Οι δεσμευτές με τους οποίους κρυσταλλοποιήθηκαν τα ένζυμα παρουσιάζονται ως σφαίρες χρώματος πράσινου. Η περιοχή του συνδέσμου που ενώνει την N- και C-τελική δομική ενότητα παρουσιάζεται με μωβ χρώμα. Οι αριθμοί καταχώρησης PDB των δομών που παρουσιάζονται δίνονται στις παρενθέσεις: **A.** Ένζυμο  $\sigma$  τάξης από καλαμάρι (1GSQ). **B.** Ένζυμο  $\omega$  τάξης από άνθρωπο (1EMM) [η προέκταση της C-τελικής περιοχής (κατάλοιπα 1 έως 19) που είναι μοναδική στην τάξη αυτή παρουσιάζεται με μαύρο χρώμα]. **Γ.** Ένζυμο  $\beta$  τάξης από βακτήριο (*Proteus mirabilis*) (1PM7). **Δ.** Ένζυμο  $\mu$  τάξης από *Fasciola hepatica* (1FHE) (Sheehan *et al.*, 2001).

---

Η N-τελική δομική περιοχή, (κατάλοιπα περίπου 1-80) είναι υψηλά συντηρημένη και παρέχει τη θέση δέσμευσης του GSH. Η τεταρτοταγή δομή της N-τελικής δομικής περιοχής υιοθετεί μια χαρακτηριστική «GST αναδίπλωση» ίδια με αυτήν της θειορεδοξίνης (Katti *et al.*, 1990) η οποία θεωρείται πρόγονος των GSTs (Armstrong, 1997). Η θειορεδοξίνη αποτελείται τέσσερις β-κλώνους που σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια πλαισιωμένους από τρεις α-έλικες (Σχήμα 1.8). Η αναδίπλωση αυτή υπάρχει σε αρκετές δομές πρωτεϊνών από άλλες οικογένειες ενζύμων οι οποίες παρουσιάζουν χαμηλή ομοιότητα στην αμινοξική τους ακολουθία αλλά συσχετίζονται όλες με τη δέσμευση κυστεΐνης ή GSH. Παραδείγματα τέτοιων οικογενειών ενζύμων είναι η DsbA (βακτηριακό ένζυμο ισοδύναμο με τη δισουλφιδική ισομεράση) (Martin *et al.*, 1993), η γλουταρεδοξίνη (Bushweller *et al.*, 1994) και η υπεροξειδάση του γλουταθείου (GPx, Epp *et al.*, 1983). Η αναδίπλωση αυτή, αποτελείται από δύο ευδιάκριτα δομικά μοτίβα, το N-τελικό βαβ (β1 κατάλοιπα 7-11, α1 κατάλοιπα 15-29, β2 κατάλοιπα 33-36) και το C-τελικό ββα (β3 κατάλοιπα 58-61, β4 κατάλοιπα 64-67, α3 κατάλοιπα 68-80) τα οποία συνδέονται με μια α-έλικα (α-2 έλικα στο Σχήμα 1.8, κατάλοιπα 43-50). Το N-τελικό μοτίβο ξεκινά με έναν αμινοτελικό β-κλώνο (β-1), ακολουθούμενο από μια α-έλικα (α-1) και έπειτα από έναν δεύτερο β-κλώνο (β-2) ο οποίος είναι παράλληλος στον β-1. Ένας βρόχος οδηγεί σε μια δεύτερη α-έλικα (α-2), η οποία συνδέεται με το C-τελικό μοτίβο. Αυτό το μοτίβο αποτελείται από δύο διαδοχικούς β-κλώνους (β-3 και β-4), οι οποίοι είναι αντιπαράλληλοι και ακολουθούνται από μια τρίτη α-έλικα (α-3) στο C-τελικό άκρο της αναδίπλωσης. Οι τέσσερις β-κλώνοι βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, με δύο α-έλικες (α-1 και α-3) κάτω από αυτό το επίπεδο και μία έλικα (α-2) πάνω από αυτό το επίπεδο.

Η σύνδεση της α2 έλικας της θειορεδοξίνης με το β-έλασμα β3 γίνεται μέσω ενός βρόγχου που περιέχει ένα χαρακτηριστικό κατάλοιπο προλίνης το οποίο είναι στη λιγότερο προτιμότερη *cis* διαμόρφωση και είναι υψηλά συντηρημένο σε όλες τις GSTs. Αυτός ο *cis*-Pro βρόγχος όπως ονομάζεται, ενώ δεν παίζει άμεσο ρόλο στην κατάλυση, φαίνεται ότι είναι σημαντικός για την καταλυτική ενεργότητα της δομής των GSTs (Allocati *et al.*, 1999). Η εξέλιξη των κυτταροπλασματικών GSTs φαίνεται να έγινε μέσω της προσθήκης μιας περιοχής ελίκων μετά τη βαβαββα δομή της θειορεδοξίνης. Η σύνδεση της N-τελικής δομικής περιοχής γίνεται μέσω ενός συνδέσμου μικρού αριθμού αμινοξικών καταλοίπων (γύρω στα δέκα) (Σχήμα 1.7) (Dirr *et al.*, 1994).



**Σχήμα 1.8.** Σχηματικό διάγραμμα που παρουσιάζει την αναδίπλωση της θειορεδοξίνης (Katti *et al.*, 1990). Οι α-έλικες παρουσιάζονται ως κύλινδροι και οι β-κλώνοι ως πορτοκαλί βέλη. Οι τέσσερις β-κλώνοι βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, με μία έλικα (α-2) κόκκινου χρώματος πάνω από αυτό το επίπεδο και οι άλλες δύο α-έλικες (α-1 και α-3) μπλε χρώματος κάτω από το επίπεδο. Ο βρόχος *cis*-Pro συνδέει την έλικα α-2 με τον κλώνο β-3. Στα GSTs ένζυμα, η N-τελική δομική περιοχή συνδέεται με την C-τελική δομική περιοχή με ένα μικρό πεπτίδιο. Στην θειορεδοξίνη, οι β-κλώνοι είναι χρωματισμένοι κίτρινοι, ενώ οι α-έλικες βαθύ κόκκινο. Η αναδίπλωση της θειορεδοξίνης σε συσχέτιση με τις GSTs έχει έναν επιπλέον β-κλώνο και μια α-έλικα στην N-τελική δομική περιοχή (κατάλοιπα 1-21) που τερματίζεται στο σημείο του γραφήματος που είναι σημασμένο με (\*) από όπου ξεκινά η αναδίπλωση. Αυτά τα επιπλέον χαρακτηριστικά της N-τελικής περιοχής παρουσιάζονται με γκρι χρώμα (Sheehan *et al.*, 2001).

Η C-τελική δομική περιοχή, (κατάλοιπα περίπου 87-210) αποτελείται από την ένωση α-ελίκων συνήθως τεσσάρων (Armstrong, 1997) καθώς ο αριθμός των α-ελίκων ποικίλει ανάμεσα στις τάξεις. Για παράδειγμα, στην π και μ τάξη η C-τελική δομική ενότητα αποτελείται από 5 α-έλικες (Reinemer *et al.*, 1991, Ji *et al.*, 1992) ενώ στην α τάξη από 6 α-

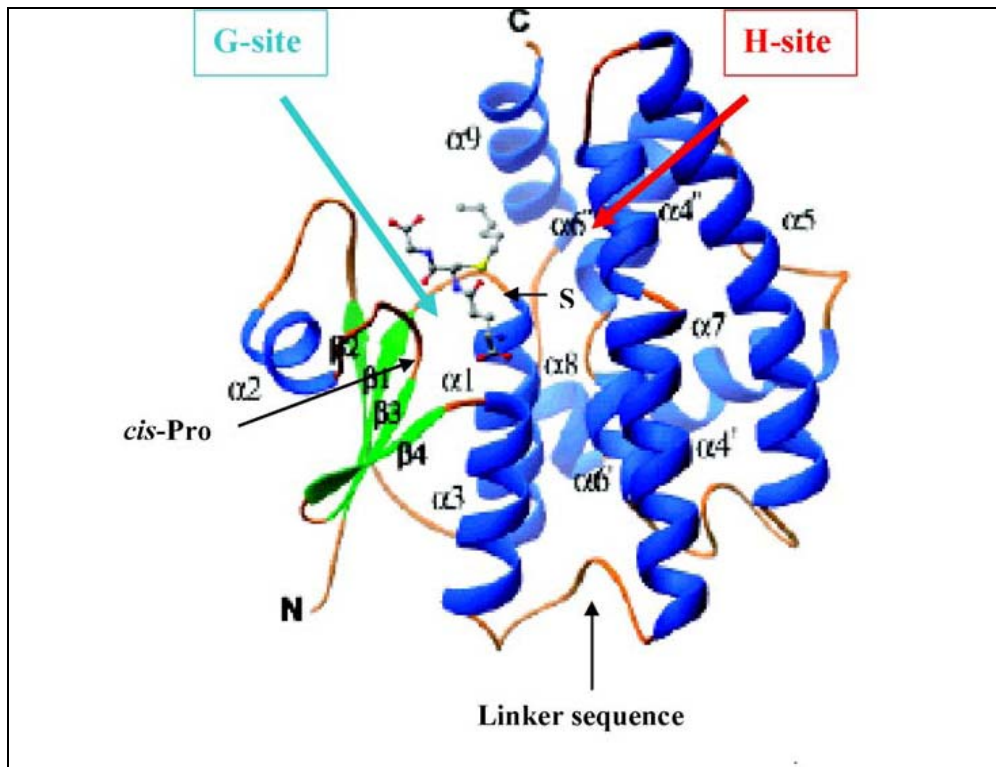
---

έλικες (Sinning *et al.*, 1993). Η C-τελική περιοχή είναι λιγότερο όμοια ανάμεσα στις τάξεις των θηλαστικών από ότι η N-τελική δομική περιοχή (Σχήματα 1.6 και 1.7) (Dirr *et al.*, 1994, Armstrong, 1997). Η δομική αυτή περιοχή περιλαμβάνει τα δύο τρίτα της πρωτεΐνης και παρέχει τα δομικά στοιχεία για την αναγνώριση των ξενοβιοτικών υποστρωμάτων. Η περιοχή αυτή συνεισφέρει τα περισσότερα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το υδρόφοβο υπόστρωμα, όπως επίσης συνεισφέρει ένα υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (στην α-4 έλικα) στην θέση δέσμευσης του γλουταθείου. Διαφορές στην καρβοξυτελική περιοχή ίσως είναι υπεύθυνες για την ιδιαιτερότητα των υποστρωμάτων ανάμεσα στις διαφορετικές τάξεις (Wilce & Parker, 1994).

Υπάρχουν δύο περιοχές δέσμευσης υποστρώματος σε κάθε μία υπομονάδα. Μία πολύ συντηρημένη στην οποία προσδέεται το GSH (G-θέση) και αποτελείται κυρίως από αμινοξικά κατάλοιπα της N-τελικής περιοχής, και μια περιοχή δέσμευσης της ηλεκτρονιόφιλης ένωσης (H-θέση) η οποία δημιουργείται κυρίως από αμινοξικά κατάλοιπα χωρίς πολικές ομάδες στις πλευρικές τους αλυσίδες που βρίσκονται στην C-τελική περιοχή (Σχήμα 1.9) (Armstrong, 1997). Οι δύο αυτές περιοχές μαζί αποτελούν το καταλυτικό ενεργό κέντρο του ενζύμου και λεπτομέρειες για αυτές θα αναφερθούν παρακάτω.

#### **1.4.1. Περιγραφή του διμερούς.**

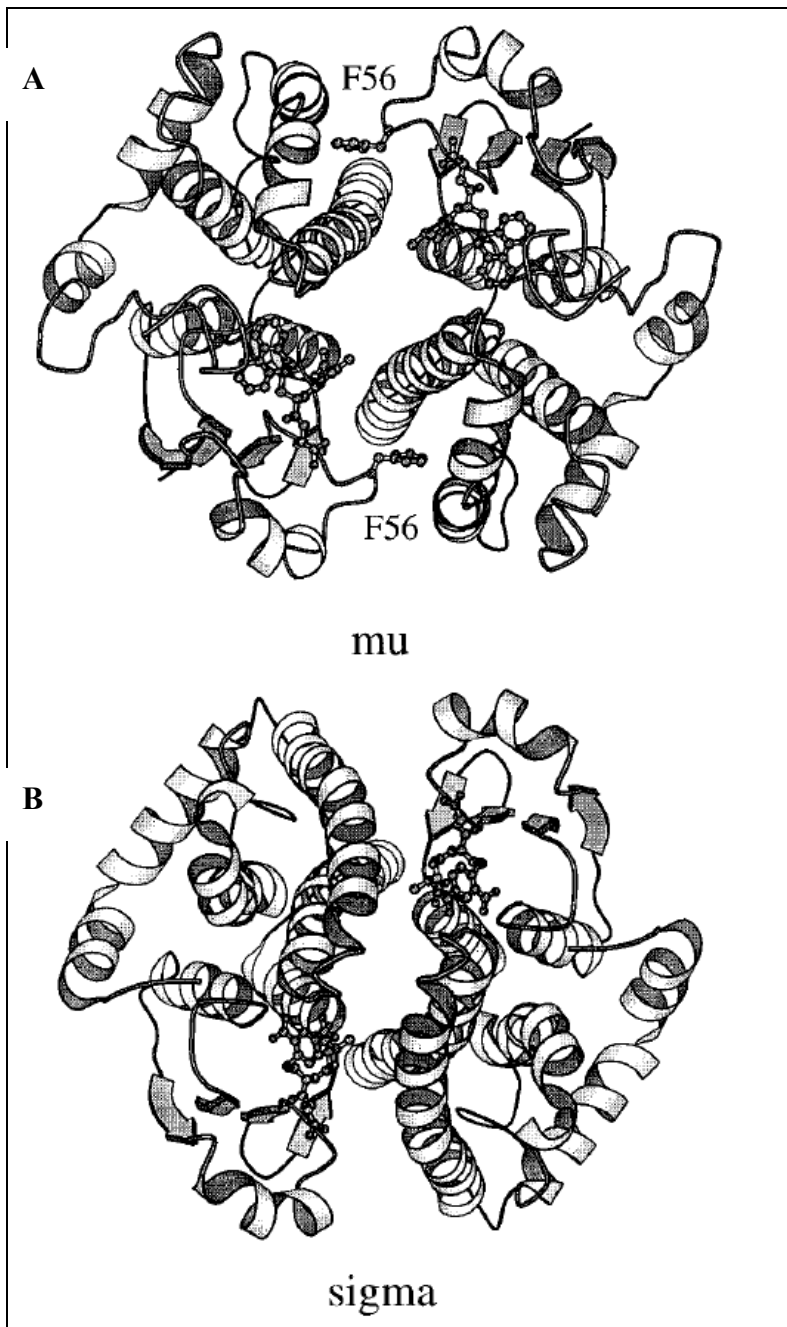
Το διμερές έχει μια άτυπη ανοιχτή διαμόρφωση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.10, με τις δύο υπομονάδες να συγκρατούνται κυρίως μέσω δύο τύπων αλληλεπιδράσεων που έχουν προσδιοριστεί μεταξύ της κοινής επιφάνειας τους τις υδρόφοβες και τις υδρόφιλες (Σχήμα 1.9, Armstrong, 1997). Η σπουδαιότερη υδρόφοβη αλληλεπίδραση που δημιουργείται σχεδόν σε όλες τις τάξεις GSTs είναι το ονομαζόμενο μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» το οποίο και προσδένει φυσικά τις δύο υπομονάδες (Vargo *et al.*, 2004). Ένα αρωματικό κατάλοιπο της N-τελικής περιοχής της μία υπομονάδας λειτουργεί ως «κλειδί» το οποίο μπαίνει μέσα σε μια «κλειδαριά» που δημιουργούν υδρόφοβα κατάλοιπα της C-τελικής δομικής περιοχής της άλλης υπομονάδας (Σχήμα 1.10.A). Το μοτίβο αυτό έχει βρεθεί στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων GSTs των τάξεων  $\alpha$ ,  $\varphi$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  και  $\pi$  (Sinning *et al.*, 1993, Reinemer *et al.*, 1996, Thom *et al.*, 2001, Hayes *et al.*, 2005).



**Σχήμα 1.9.** Παρουσίαση της δομής του ενζύμου TaGSTU4 της  $\tau$  τάξης από σιτάρι. Οι  $\alpha$ -έλικες παρουσιάζονται ως περιελίξεις και οι  $\beta$ -κλώνοι ως βέλη. Ο παρεμποδιστής S-φαινυλ-γλουταθείο αναπαριστάται με σφαίρες και ράβδους σύμφωνα με τον ατομικό του τύπο. Το μπλε και το κόκκινο βέλος υποδεικνύουν την θέση δέσμευσης του GSH (G-θέση) και τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (H-θέση) αντίστοιχα. Επίσης στο σχήμα επισημαίνονται το καταλυτικό κατάλοιπο της Ser, ο *cis*-Pro βρόγχος και η περιοχή του συνδέσμου των N- και C-δομικών περιοχών (Frona *et al.*, 2006).

Ο δεύτερος τύπος αλληλεπιδράσεων της κοινής επιφάνειας των δύο υπομονάδων είναι περισσότερο υδρόφιλος και εκλείπει το μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» (Σχήμα 1.10.B). Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις έχουν οι τάξεις  $\sigma$  και  $\theta$  (Armstrong, 1997) των GSTs. Δομικά οι GSTs της  $\theta$  τάξης δεν έχουν το βρόγχο που προτάσσει το κατάλοιπο Phe για αλληλεπίδραση με τις  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  έλικες ούτε και την υδρόφοβη κοιλότητα μέσα στις δύο αυτές έλικες (Hayes *et al.*, 2005). Στην τάξη αυτή η σταθεροποίηση του διμερούς βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνων μεταξύ των καταλοίπων των υπομονάδων.





**Σχήμα 1.10.** Παρουσίαση της δομής των διμερών GSTs ενζύμων των τάξεων  $\mu$  (**A**) και  $\sigma$  (**B**) με τους άξονες του διμερούς επί της σελίδας σε αναπαράσταση cartoon. **A.** Στο διμερές της τάξης  $\mu$  αναπτύσσονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων και το μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» όπως και στις GSTs τάξεις  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ . Το αμινοξικό αρωματικό κατάλοιπο Phe56 που είναι το «κλειδί» της μίας υπομονάδας που πάει και «κλειδώνει» μεταξύ των ελίκων R4 και R5 της απέναντι υπομονάδας παρουσιάζεται με σφαίρες και ράβδους. **B.** Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων των τάξεων  $\sigma$  και  $\theta$  δεν παρουσιάζουν αυτό το μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» αλλά έχουν περισσότερο υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις και αντιπροσωπεύονται από το διμερές της τάξης  $\sigma$  (Armstrong, 1997).

---

Η εξειδίκευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων στην κάθε τάξη GST εμποδίζει τη δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ GST υπομονάδων διαφορετικών τάξεων (Hayes & Pulford, 1995, Hayes *et al.*, 2005, Frova, 2006). Σπάνιες είναι οι περιπτώσεις που έχουν βρεθεί μονομερείς μορφές ενζύμων GST να είναι λειτουργικές όπως αυτές των  $\lambda$  και DHAR τάξεων των φυτικών GSTs (Dixon *et al.*, 2002a). Οι μονομερείς αυτές μορφές των ενζύμων δεν προϋποθέτουν τη σύζευξη με το GSH για να λειτουργήσουν και δεν έχουν δράση υπεροξειδάσης (Dixon *et al.*, 2002a).

#### **1.4.2. Περιοχή δέσμησης του GSH (G-θέση).**

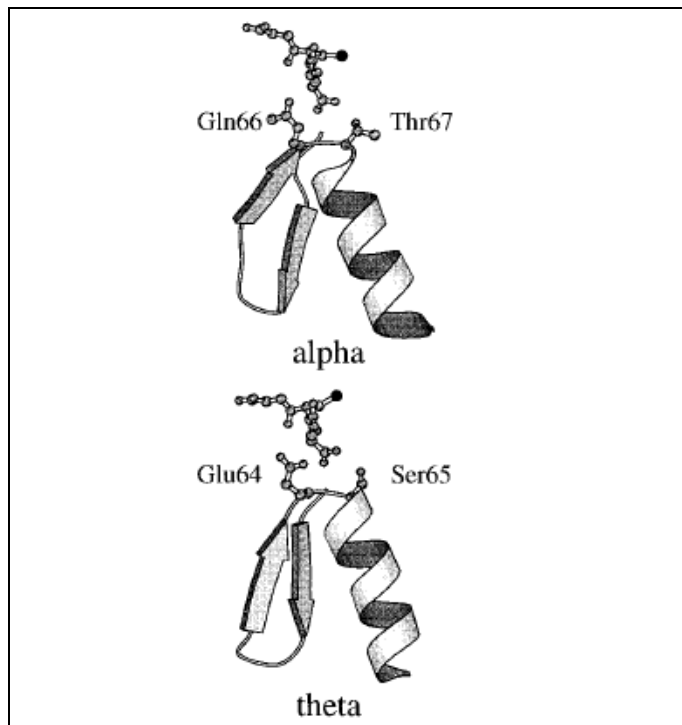
Η G-θέση είναι υψηλά συντηρημένη σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας και όπως αναφέρθηκε βρίσκεται στη N-τελική δομική περιοχή. Ίσως η πιο θεμελιώδης πλευρά του καταλυτικού μηχανισμού είναι πως τα ένζυμα χρησιμοποιούν τις αλληλεπιδράσεις δέσμησης του GSH έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί το θείο για την νουκλεόφιλη προσβολή. Σε κάθε μονομερές, ένα μόριο GSH δεσμεύεται στη G-θέση. Το τριπεπτιδίο του GSH προσδένεται σε μια εκτεταμένη διαμόρφωση με το  $\gamma$ -γλουταμυλ-τμήμα του να έχει κατεύθυνση προς τα κάτω προς την περιοχή αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων του διμερούς, το κυστεΐνυλ-τμήμα του με κατεύθυνση προς την υπομονάδα που είναι δεσμευμένο και το γλυκυλ-τμήμα του κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Παρόλο που η τοποθέτηση του GSH στην G-θέση είναι περίπου η ίδια στα GSTs ένζυμα υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις αλληλεπιδράσεις και τους υδρογονικούς δεσμούς που σχηματίζονται για την δέσμηση του GSH (Armstrong, 1997). Η πιο συντηρημένη περιοχή της δομής σε όλα τα GSTs ένζυμα είναι το μοτίβο ββα το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του  $\gamma$ -γλουταμύλ-τμήματος του GSH (Armstrong, 1997) και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.11.

Πολλαπλοί πολικοί δεσμοί συνεισφέρουν στην πρόσδεση του φορτισμένου τριπεπτιδίου του GSH. Στη G-θέση βρίσκεται και το συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο που αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη σουλφυδρυλομάδα του GSH για να παραχθεί το καταλυτικά ενεργό ανιόν του σουλφυδρυλίου ( $\text{GS}^-$ ) (Armstrong, 1997, Labrou *et al.*, 2001, Frova, 2006). Στις τάξεις  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$  των GSTs το συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο είναι Tyr, στις τάξεις  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  και  $\phi$  είναι Ser και στις τάξεις  $\omega$  και  $\lambda$  είναι Cys (Board *et al.*, 2000). Από τα αποτελέσματα ανάλυσης κρυσταλλικών δομών GSTs πρωτεϊνών προέκυψε ότι το καταλυτικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το

---

άτομο θείου του GSH και είναι έτσι τοποθετημένο ώστε να σταθεροποιεί το ανιόν της σουλφυδρυλίου του GSH και να αυξάνει τη νουκλεοφιλικότητα του. Επιπρόσθετα το σημαντικό αυτό κατάλοιπο μπορεί να συνεισφέρει στη σωστή διεύθυνση της σουλφυδρυλικής ομάδας κατά την κατάλυση.

Οι αναλύσεις των κρυσταλλικών δομών υποδεικνύει ότι εκτός από το καταλυτικό κατάλοιπο υπάρχει και ένας αριθμός άλλων τρόπων που μπορεί να σταθεροποιούν το ανιόν του σουλφυδρυλίου. Η έλικα α1 έχει βρεθεί ότι παίζει επίσης ρόλο στη σταθεροποίηση αυτή (Wilce & Parker, 1994). Επίσης έχει προσδιοριστεί θετικό ηλεκτροστατικό φορτισμένο δυναμικό στην G-θέση που είναι χαρακτηριστικό σε όλες τις GSTs και μάλλον συνεισφέρει στον ιονισμό του ανιόντος του σουλφυδρυλίου του GSH (Labrou *et al.*, 2001).



---

**Σχήμα 1.11.** Παρουσίαση του υψηλά συντηρημένου ββα μοτίβο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του γ-γλουταμύλ-τμήματος του GSH. Το GSH και οι πλευρικές αλυσίδες που βρίσκονται στην στροφή ανάμεσα στον β4-κλώνο και την α3-έλικα και παίρνουν μέρος στους υδρογονικούς δεσμούς με τα α-άμινο και α-καρβόξυ τμήματα του γ-γλουταμύλ-τμήματος του GSH παρουσιάζονται ως σφαίρες και ράβδους. Τα δύο μοτίβα που παρουσιάζονται, προέρχονται από τις δύο τάξεις θ και α που διαφέρουν πιο πολύ ανάμεσα στις κυτταροπλασματικές GSTs, (Armstrong, 1997).

#### 1.4.3. Περιοχή δέσμευσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος (H-θέση).

---

Οι GSTs είναι γνωστό πως δεσμεύουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, λόγω του χαμηλού ποσοστού στην ομοιότητα στις ακολουθίες της C-τελικής δομικής περιοχής τους της οποίας τα αμινοξικά κατάλοιπα είναι υπεύθυνα για την δέσμευση των ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων. Η Η-θέση μαζί με την C-τελική δομική περιοχή είναι κυρίως υδρόφοβη, με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων να δρουν ως δότες δεσμών υδρογόνου (Thom *et al.*, 2002). Η Η-θέση αποτελείται πρωτίστως από τρία ή τέσσερα ξεχωριστά κομμάτια της πρωτοταγής δομής, που συσπειρώνονται στην διπλωμένη πρωτεΐνη και σχηματίζουν μια «τσέπη» γειτονικά της G-θέσης. Η θέση αυτή παρουσιάζει κάποια δομική ευελιξία και κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να προσδέσει το υπόστρωμα μέσα από μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές προσαρμογές ιδιαίτερα τα κινητά κατάλοιπα του C-τελικού άκρου μπορεί να επιτρέψει το επαγόμενο «ταίριασμα» υποστρώματος και ένζυμου.

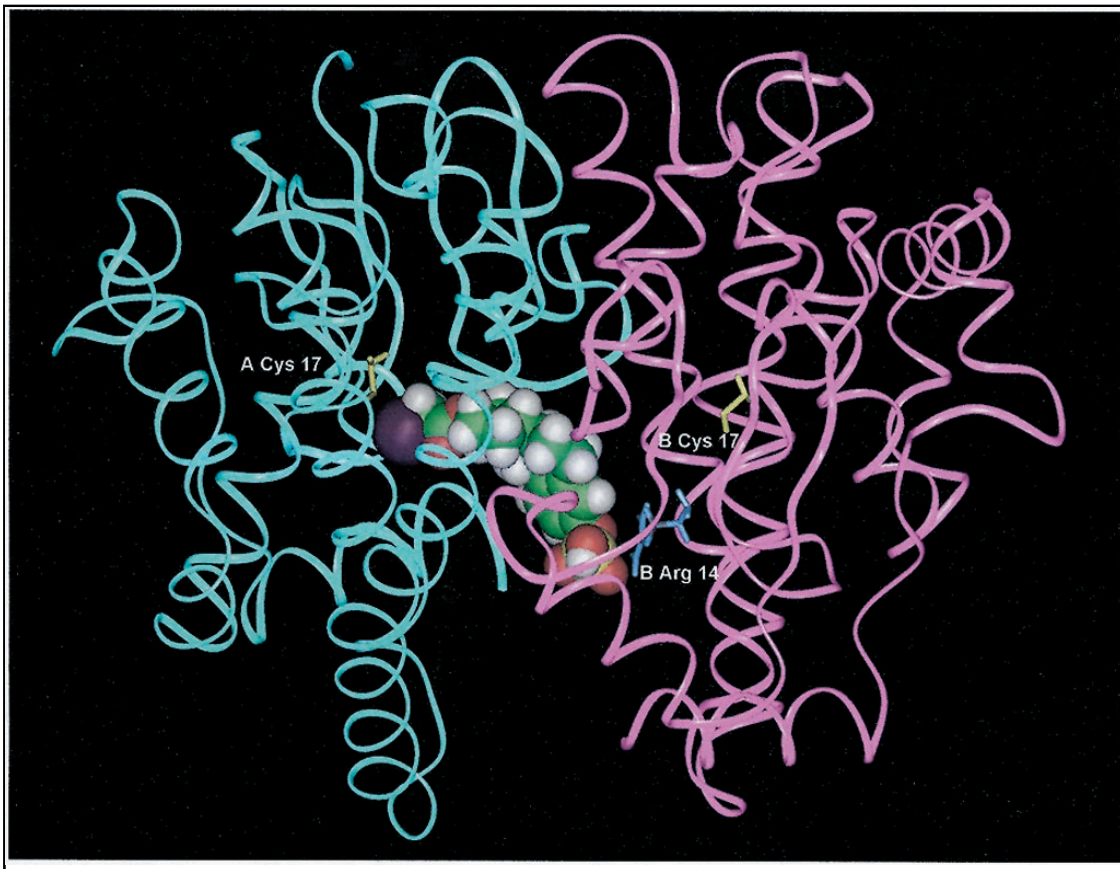
#### 1.4.4. Περιοχή αλληλεπίδρασης με δεσμευτή (L-θέση).

Εκτός από καταλυτικά κέντρα δέσμευσης υποστρωμάτων στις GSTs έχουν βρεθεί και μη-καταλυτικά κέντρα δέσμευσης. Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 1.3.4 ένας σημαντικός αριθμός υδρόφοβων υποστρωμάτων όπως έχει βρεθεί ότι προσδέεται σε τέτοια κέντρα δέσμευσης που έχουν ονομαστεί 'ligandin site' (Hayes *et al.*, 2005). Η ύπαρξη της L-θέσης επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι υποστρώματα μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης GSTs ενζύμων από *Schistosoma japonica* (SjGST) (McTigue *et al.*, 1995) και από καλαμάρι (Ji *et al.*, 1996). Επίσης η σήμανση συγγένειας του ενζύμου rGST1-1 που ανήκει στην  $\alpha$  τάξη και έχει απομονωθεί από ήπαρ αρουραίου αποκάλυψε μια υψηλής συγγένειας περιοχή αλληλεπίδρασης-δέσμευσης (L-θέση) ανάμεσα στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων (Vargo & Colman, 2001) (Σχήμα 1.12). Σε τέτοιες περιπτώσεις που η L-θέση βρίσκεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων, η δεύτερη περιοχή δέσμευσης (L-θέση) που δημιουργείται στα ετεροδιμερή θα είναι διαφορετική από αυτή που δημιουργείται στα ομοδιμερή και αυτό είναι ένας εξελικτικός λόγος της ευεργετικής επίδρασης που έχει ο ετεροδιμερισμός μέσα στα μέλη των τάξεων  $\alpha$  και  $\mu$  (Hayes *et al.*, 2005).

Στην περίπτωση του ενζύμου από το φυτό *Arabidopsis*, η L-θέση όπως αποδείχτηκε από κρυσταλλογραφικές μελέτες βρίσκεται δίπλα στην G-θέση ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των ελίκων  $\alpha 3''/\alpha 3'''$  και  $\alpha 5''$  (Reinemer *et al.*, 1996). Ενώ στην περίπτωση του

---

ανθρώπινου GST P1-1 ενζύμου η L-θέση βρίσκεται στην ηλεκτρονιόφιλη θέση δέσμησης υποστρωμάτων δηλαδή στην H-θέση (Oakley *et al.*, 1999).



---

**Σχήμα 1.12.** Παρουσίαση της L-θέσης που βρίσκεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων στο δομικό μοντέλο του ενζύμου rGSTA1-1 που δημιουργήθηκε με τη βοήθεια της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου hGSTA1-1. Οι δύο υπομονάδες παρουσιάζονται με χρώματα ουρανό και μωβ. Στο σχήμα παρουσιάζεται το μόριο της 3,17-διθειικής-17β-οιστραδιόλης προσδεμένο στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων, στην υποτιθέμενη L-θέση (Vargo & Colman, 2001).

## 1.5. Γενικά για το ένζυμο SjGST.

### 1.5.1. GSTs από παρασιτικούς σκώληκες.

Οι παρασιτικοί σκώληκες όπως οι *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* και *Ascaris lumbricoides* είναι σημαντικά παράσιτα που επηρεάζουν την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν γενικά χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας ενζύμων της φάσης I καθώς και γενικότερα ενζύμων αποτοξίνωσης (όπως καταλάση, κυτόχρωμα P450)

---

άλλα υψηλή έκφραση GSTs ενζύμων ιδιαίτερα κατά την άμυνα αυτών των οργανισμών έναντι φαρμάκων (Brophy & Barrett, 1990). Τα GSTs των παρασιτικών σκώληκων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες αυτά με μοριακή μάζα 26kDa και αυτά με μοριακή μάζα 28kDa με διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος (Walker *et al.*, 1993). Θεωρείται ότι εμποδίζουν την συσσώρευση τοξίνων στους σκώληκες μέσω της κατάλυσης και της σύζευξης του γλουταθείου σε προϊόντα υπεροξειδωσής λιπιδίων και άλλες τοξίνες (Walker *et al.*, 1993) και με τη διευκόλυνση της εξαγωγής των τοξικών υδροφοβικών μεταβολιτών του ξενιστή όπως την αίμη (Davern *et al.*, 1990). Για το λόγο αυτό τα GSTs από αυτούς τους οργανισμούς χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία εμβολίων. Ενέσεις GSTs προκαλούν την μερική προστασία (52 με 62%) ενάντια της μόλυνσης από το *Schistosoma mansoni* και το *S. japonica* σε τρωκτικά (Balloul *et al.*, 1987, Sher *et al.*, 1989, Davern *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1986) και από το *Fasciola hepatica* σε πρόβατα (Sexton *et al.*, 1990).

Έχουν προσδιοριστεί αρκετά GSTs από παρασιτικούς σκώληκες όπως το GST ένζυμο του νηματώδη σκώληκα *Ascaridia galli* το οποίο έχει βρεθεί ότι ανήκει στην  $\sigma$  τάξη και προάγει την σύνθεση της προσταγλαδίνης E σε πολυκυτταρικά παράσιτα (Meyer & Thomas, 1995, Meyer *et al.*, 1995) καθώς και άλλα GSTs από τα γένη *Ascaris*, *Schistosoma* και *Fasciola* (Sheehan *et al.*, 2001). Επίσης έχουν καθοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας οι τρισδιάστατες δομές δύο GSTs ενζύμων από παρασιτικούς σκώληκες, ένα από το νηματώδη *Schistosoma japonica* (Lim *et al.*, 1994, McTigue *et al.*, 1995) και ένα από το τρηματώδη σκώληκα του ήπατος *Fasciola hepatica* (Rossjohn *et al.*, 1997). Όσον αφορά την ταξινόμηση των GSTs των οργανισμών αυτών έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα με τις τάξεις  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$  άλλων οργανισμών αλλά περιέχουν αρκετές περιοχές που παρουσιάζουν διαφορετικότητα στη δομή σε σχέση με GSTs ένζυμα των ξενιστών τους και κατά αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η προοπτική της δημιουργίας εμβολίων με εξειδίκευση έναντι των παρασίτων (Sheehan *et al.*, 2001).

### **1.5.2. GSTs από *Schistosoma* –SjGST.**

Οι παρασιτικοί σκώληκες του γένους *Schistosoma* προκαλούν μια παρασιτική ασθένεια που ονομάζεται σχιστοσωμίαση (schistosomiasis) η οποία προσβάλλει 275.000.000 ανθρώπους παγκοσμίως και προκαλεί 200.000 θανάτους ετησίως (Lucey & Maguir, 1993, Jao *et al.*, 2006). Οι σκώληκες ζουν στα αιμοφόρα αγγεία των ξενιστών θηλαστικών. Οι

---

ξενιστές αντιδρούν στην παρουσία των σκωλήκων κυρίως όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο των αυγών, λόγω της δημιουργίας κοκκιομάτων που οδηγούν σε σοβαρές ζημιές ιστών (Shekhar, 1991). Τα κυριότερα είδη που προσβάλλουν τους ανθρώπους είναι τα εξής: *S. mansoni*, *S. haematobium* και *S. japonicum* και διαφέρουν πολύ μεταξύ τους ως προς τους ιστούς που προσβάλλουν και την κλινική τους εκδήλωση (Lucey & Maguire, 1993). Το πιο αποτελεσματικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για την θεραπεία της σχιστοσωμιάσης χωρίς σοβαρές παρενέργειες είναι το praziquantel (PZQ) (Andrews *et al.*, 1983) του οποίου ο στόχος και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως γνωστός (Shekhar, 1991).

Τα GSTs ένζυμα από *Schistosoma* καθώς όπως προείπαμε αποτελούν την αρχικά άμυνα των σκωλήκων αυτών έναντι σε ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα και οξειδωτικές ζημιές (Brophy & Barrett, 1990) έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας εξαιτίας της ανθεκτικότητας τους στο φάρμακο PZQ κατά τη θεραπεία της σχιστοσωμιάσης. Αποτελούν τον κυριότερο στόχο εμβολίων και έναν πολύ ενδιαφέρον στόχο φαρμάκων έναντι στη σχιστοσωμιάση αλλά και άλλων ασθενειών που προκαλούνται από παρασιτικούς σκώληκες (Brophy & Barrett, 1990). Έχουν βρεθεί δύο GST ισοένζυμα μοριακής μάζας 28kDa και 26kDa στον νηματώδη σκώληκα *Schistosoma japonica* (Walker *et al.*, 1993).

Το ομοδιμερές (μοριακής μάζας 26kDa η κάθε υπομονάδα) ένζυμο *SjGST* που είναι και το ένζυμο που αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας αποτελεί μέλος μίας από τις πιο σημαντικές οικογένειες ενζύμων που εμπλέκονται στη φάση II του μεταβολισμού ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων (Armstrong, 1991). Τα συζευγμένα με το GSH υποστρώματα γίνονται έτσι πιο ευδιάλυτα στο νερό και κατά αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η εξαγωγή τους από το κύτταρο, μεταβολίζονται και τελικά εκκρίνονται. Το ένζυμο *SjGST* αποτέλεσε αντικείμενο ενδιαφέροντος για πρώτη φορά όταν προσδιορίστηκε από τον Smith και τους συνεργάτες του (Smith *et al.*, 1986) ότι αποτελεί το κυριότερο αντιγόνο που μπορεί να επάγει ανοσοποιητική προστασία στον ξενιστή-ποντίκι.

### **1.6. Δομή του ενζύμου *SjGST*.**

Εξαιτίας του σημαντικού βιολογικού ρόλου του *SjGST* έχουν προσδιοριστεί διάφορες κρυσταλλικές δομές του ενζύμου. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *SjGST* σε σύντηξη με ένα μικρό επιτόπιο από HIV1 από άνθρωπο προσδιορίστηκε με μοριακή αντικατάσταση χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες της δομής GST ενζύμου της  $\mu$  τάξης από αρουραίο (Ji

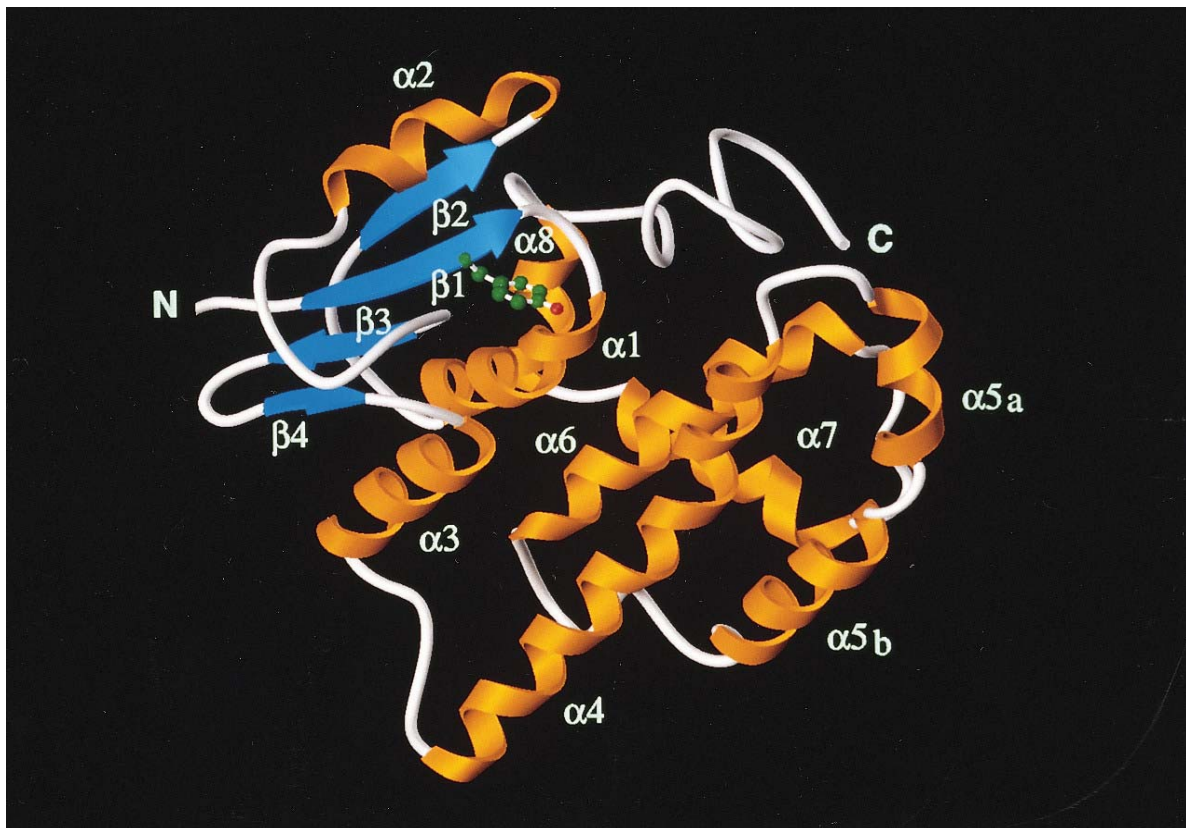
---

*et al.*, 1992). Από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η δομή του *SjGST* έχει πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τη  $\mu$  τάξη GST ενζύμων κυρίως στην N-τελική δομική περιοχή (Lim *et al.*, 1994). Επίσης προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή του ενζύμου *SjGST* ελεύθερη υποστρώματος με ανάλυση σε 2,4 Å (McTigue *et al.*, 1995) και συγκρίθηκε με τις GST δομές των τάξεων  $\alpha$  από άνθρωπο (Sinning *et al.*, 1993),  $\pi$  από γουρούνι (Reinemer *et al.*, 1992b),  $\mu$  από αρουραίο (Ji *et al.*, 1992). Με στόχο την κατανόηση της δράσης του φαρμάκου PZQ και ενδεχομένως τον σχεδιασμό καινούργιων βελτιωμένων φαρμάκων προσδιορίστηκε και η κρυσταλλική δομή του ενζύμου σε σύμπλοκο με το PZQ με ανάλυση σε 2,6 Å (McTigue *et al.*, 1995). Από τον προσδιορισμό αυτής της δομής διαπιστώθηκε ότι το PZQ δεσμεύεται στο *SjGST* διμερές σε συγκεντρώσεις του φαρμάκου που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς και προσδιορίστηκε και η L-θέση δέσμευσης του ενζύμου. Οι δύο αυτές δομές του *SjGST*, χωρίς υπόστρωμα στο ενεργό του κέντρο και σε σύμπλοκο με το φάρμακο PZQ, θα αναλυθούν στην συνέχεια.

#### **1.6.1. Χαρακτηριστικά της δομής του ενζύμου *SjGST* χωρίς υπόστρωμα στο ενεργό του κέντρο.**

Τα 218 αμινοξικά κατάλοιπα κάθε υπομονάδας του *SjGST* παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική GST αναδίπλωση και αποτελούνται από δύο δομικές περιοχές: μια μικρή N-τελική δομική περιοχή με μοτίβο  $\alpha/\beta$  (κατάλοιπα 1 έως 76) που συνδέεται με μια μικρή περιοχή συνδέσμου (κατάλοιπα 77 έως 84) με την μεγάλη C-τελική δομική περιοχή με μοτίβο  $\alpha$ -έλικες (κατάλοιπα 85 έως 218) (McTigue *et al.*, 1995). Η N-τελική δομική περιοχή αποτελείται από τρεις  $\alpha$ -έλικες και τέσσερις  $\beta$ -κλώνους που σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια (Σχήμα 1.13). Η C-τελική δομική περιοχή αποτελείται από πέντε  $\alpha$ -έλικες και μία μακριά σπείρα (κατάλοιπα 195 έως 218) μετά τον τελευταίο  $\alpha$ -έλικα ( $\alpha 8$ ) (Σχήμα 1.13).





**Σχήμα 1.13.** Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής της υπομονάδας του SjGST και της θέσης του καταλυτικού αμινοξικού κατάλοιπου Tyr7. Οι α-έλικες παρουσιάζονται με πορτοκαλί χρώμα, τα β-ελάσματα με μπλε βέλη και οι στροφές και οι βρόχοι με λευκό. Σε παρένθεση παραθέτονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις αντίστοιχες δευτεροταγής δομές: β1 (3-7), α1 (15-24), β2 (29-33), α2 (38-44), β3(57-60), β4 (63-66), α3 (67-76), α4 (88-109), α5<sub>a</sub> (115-122), α5<sub>b</sub> (126-137), α6 (152-165), α7 (174-184) και α8 (189-194). Οι τέσσερις β-κλώνοι είναι παραταγμένα ο β1 παράλληλο με τον β2, ο β1 αντιπαράλληλα με τον β3 και ο β3 αντιπαράλληλα με τον β4. Η α5 έλικα περιέχει ένα μικρό «σπάσιμο» μεταξύ των καταλοίπων 123 και 125. Το καταλυτικό κατάλοιπο της τυροσίνης (Tyr7) παρουσιάζεται με σφαίρες και ράβδους όπου τα άτομα του άνθρακα έχουν πράσινο χρώμα και τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων κόκκινο. Επίσης, το καρβοξυ-τελικό και το αμινο-τελικό άκρο σημειώνονται με C και N αντίστοιχα. (Mc Tigie *et al.*, 1995).

Η ανοιχτή αναδίπλωση φουρκέτας που σχηματίζεται από τα τελευταία οχτώ αμινοξικά κατάλοιπα (κατάλοιπα 211 έως 218, Gly-Gly-Gly-Asp-His-*cis*Pro-Pro-Lys) δεν εμφανίζεται σε καμία άλλη από τις γνωστές δομές GSTs από θηλαστικά και αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού που παράχθηκαν ενάντια στο SjGST (McTigue *et al.*, 1995). Με εξαίρεση αυτή τη φουρκέτα η συνολική δομική

---

αναδίπλωση του *SjGST* ομοιάζει με αυτή των GSTs θηλαστικών των τάξεων  $\alpha$  από άνθρωπο (Sinning *et al.*, 1993),  $\pi$  από γουρούνι (Reinemer *et al.*, 1992b),  $\mu$  από αρουραίο (Ji *et al.*, 1992). Οι περιοχές με την μεγαλύτερη δομική ανομοιότητα ανάμεσα στο *SjGST* και στα GSTs των θηλαστικών που αναφέρθηκαν παραπάνω βρίσκονται στα κατάλοιπα 33 έως 41 και 200 έως 218, τα οποία κατάλοιπα αποτελούν μέρος της θέσης δέσμευσης του ξενοβιοτικού υποστρώματος (H-θέση) όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Οι δύο υπομονάδες του *SjGST* σχηματίζουν ένα διμερές με μοριακές διαστάσεις 57 Å x 47 Å x 44 Å (Σχήμα 1.14). Οι άξονες περιστροφής που συσχετίζουν τις δύο υπομονάδες του διμερούς βρίσκεται περίπου 11 βαθμούς από τον άξονα της έλικας  $\alpha 4$ . Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοινής επιφάνειας των δύο υπομονάδων είναι τα εξής: 50 έως 53 ( $\beta$ -στροφή), 63 έως 66 ( $\beta 4$ ), 67 έως 76 ( $\alpha 3$ ), 77 έως 85 (βρόγχος), 88 έως 109 ( $\alpha 4$ ) και 129 έως 136 ( $\alpha 5$ ). Μεταξύ αυτών των αλληλεπιδράσεων συμπεριλαμβάνονται και δύο γέφυρες άλατος (Asp77–Arg89 και Glu51–Arg136). Η σπουδαιότερη υδρόφοβη αλληλεπίδραση είναι το μοτίβο «κλειδαριάς-κλειδιού» (παράγραφος 1.4.1) που σχηματίζεται με την διείσδυση της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου Phe52 της μίας υπομονάδας μεταξύ των καταλοίπων 91 έως 94 της  $\alpha 4$  έλικας και 129 έως 133 της  $\alpha 5$  έλικας της άλλης υπομονάδας. Η συγκρότηση του διμερούς δημιουργεί μία μακριά (40 Å), στενή (περίπου 6 με 10 Å) οπή.

### **1.6.2. Χαρακτηριστικά της δομής του ενζύμου *SjGST* σε σύμπλοκο με το φάρμακο PZQ-L-θέση δέσμευσης.**

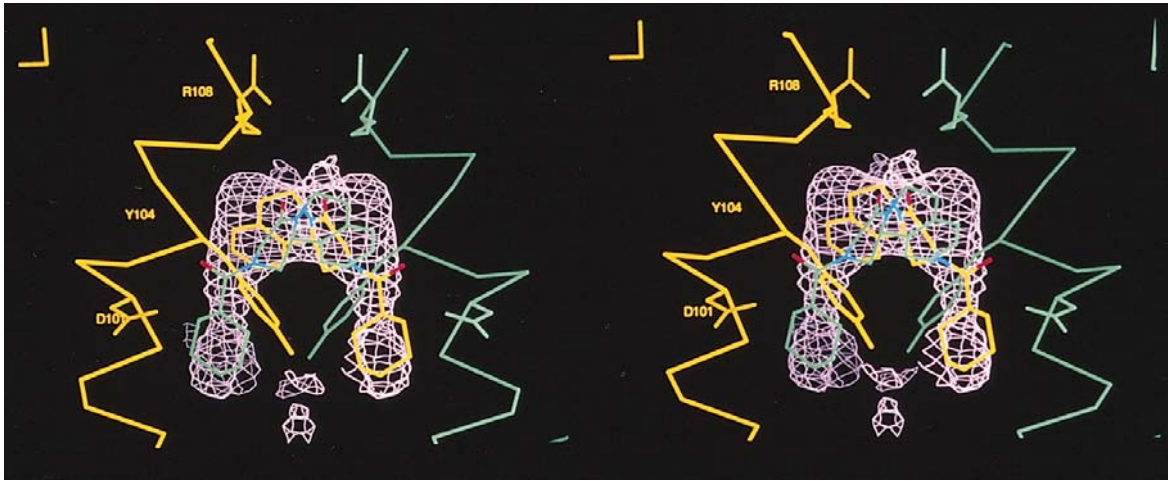
Επίσης το *SjGST* κρυσταλλοποιήθηκε σε σύμπλοκο με το φάρμακο PZQ (McTigue *et al.*, 1995). Η συγκέντρωση του φαρμάκου στο σύμπλοκο αυτό ήταν 13  $\mu$ M που βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών συγκέντρωσης που βρίσκεται σε ξενιστές στους οποίους χορηγείται το φάρμακο PZQ (Shu-hua *et al.*, 1991). Στην κρυσταλλική δομή



**Σχήμα 1.14.** Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του διμερούς του ενζύμου *SjGST* και της L-θέση που βρίσκεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων. Οι δύο υπομονάδες παρουσιάζονται με χρώματα μπλε και κίτρινο. Το καταλυτικό κατάλοιπο της Tyr7 (χρώματος άσπρου) και οι δύο διαμορφώσεις δέσμησης του φαρμάκου PZQ (χρώματος πορτοκαλί και μωβ) το οποίο προσδένεται στη μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων ενώνοντας τα δύο ενεργά κέντρα αναπαρίστανται με σφαίρες και ράβδους (McTigue *et al.*, 1995).

του συμπλόκου *SjGST*-PZQ (με ανάλυση σε 2,6 Å) ένα φάρμακο δεσμεύεται σε κάθε ομοδιμερές, σε μια περιοχή της επιφάνειας του διμερούς γειτονικά στις δύο καταλυτικές θέσεις (G- και H-θέση) (Σχήμα 1.14, 1.15). Οι άξονες περιστροφής του διμερούς «κόβουν» τη θέση δέσμησης του με τέτοιο τρόπο ώστε έτσι μπορεί να καταλάβει καθεμία, αλλά όχι και τις δύο επικαλυπτόμενες συμμετρικές περιοχές δέσμησης G- και H-θέσεις.

Το PZQ δημιουργεί δεσμούς με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Gln67, Gly97, Leu100, Asp101, Tyr104 και Arg108 της α4 έλικας της μίας υπομονάδας και επίσης με τη πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου Tyr104 της δεύτερης υπομονάδας (Σχήμα 1.15) (McTigue *et al.*, 1995). Ο τρόπος αυτός δέσμησης του PZQ στο ένζυμο *SjGST* είναι μοναδικός καθώς οι γνωστές δομές GSTs ενζύμων από θηλαστικά δεν έχουν κατάλοιπο τυροσίνης στην θέση 104 που αποτελεί και το κατάλοιπο με την μεγαλύτερη επαφή με το PZQ. Τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα στις δομές των GSTs από θηλαστικά (Cys



**Σχήμα 1.15.** Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής της θέσης δέσμευσης του φαρμάκου PZQ (L-θέση) στο ένζυμο *SjGST*. Τα τμήματα των δύο υπομονάδων παρουσιάζονται με χρώματα μπλε και κίτρινο. Τα άτομα οξυγόνου των καρβονυλίων και αζώτου του PZQ παρουσιάζονται με χρώματα κόκκινο και μπλε αντίστοιχα. Επίσης στο σχήμα παρουσιάζονται οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Asp101 (D101), Tyr104 (Y104) και Arg108 (R108) της α4 έλικας τα οποία αλληλεπιδρούν με το PZQ (McTigue *et al.*, 1995).

στο GST ένζυμο α τάξης από άνθρωπο, Glu στο GST ένζυμο π τάξης από γουρούνι και Met στο GST ένζυμο μ τάξης από αρουραίο) δημιουργούν κακή στεreoχημική επαφή με το PZQ στην θέση που βρίσκεται προσδεμένο στην δομή του ενζύμου *SjGST* (McTigue *et al.*, 1995). Η θέση δέσμευσης του PZQ βρίσκεται 9,6 Å από την υδροξυλική ομάδα του καταλοίπου Tyr7 το οποίο είναι και το συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο (βλέπε παράγραφο 1.4.2). Συνεπώς το ένζυμο *SjGST* δεν φαίνεται να καταλύει την νουκλεόφιλη προσβολή του GSH στο PZQ αλλά είναι περισσότερο πιθανών να προσδένει το PZQ σε ένα μη καταλυτικό κέντρο δέσμευσης, την L-θέση δέσμευσης (παράγραφος 1.4.4) (McTigue *et al.*, 1995).

Συνεπώς η δομή του συμπλόκου *SjGST*-PZQ αποκαλύπτει έναν καινούργιο πρωτεϊνικό στόχο για το PZQ και υποδεικνύει έναν μηχανισμό δράσης του φαρμάκου ως παρεμποδιστής αλλά μη-υπόστρωμα του GST ενζύμου. Το PZQ προσδέεται σε ένα «κανάλι» που ενώνει τις δύο H-θέσεις δέσμευσης του διμερούς υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως τα μεγάλα μεγέθους ξеноβιοτικά και ενδογενή ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα να προσδέονται στη θέση δέσμευσης του PZQ (McTigue *et al.*, 1995). Οι έρευνες για την πλήρη κατανόηση της φύσης και λειτουργίας της L-θέσης δέσμευσης του ενζύμου συνεχίζονται (Cardoso *et al.*, 2003, Yassin *et al.*, 2003, 2004, Rufier *et al.*, 2005).

---

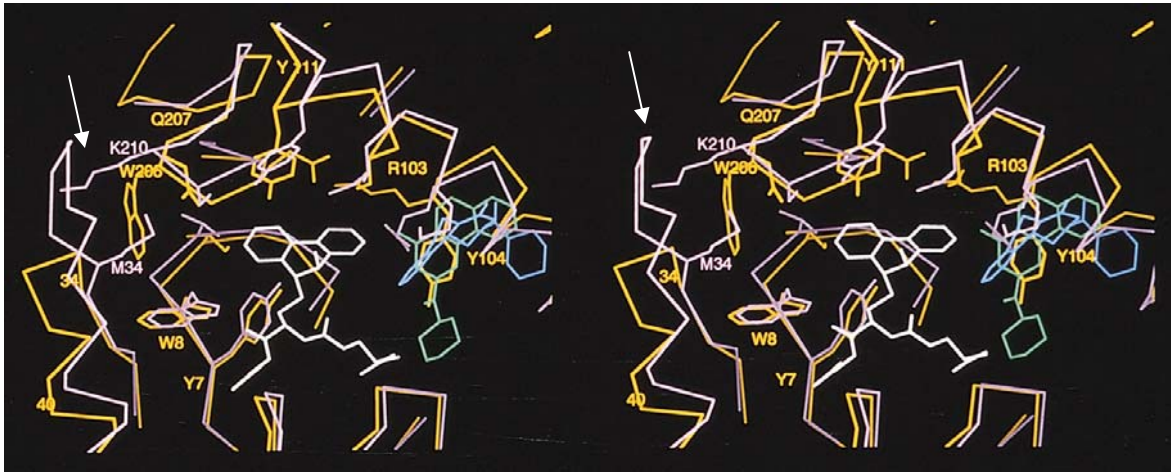
### 1.6.3. Σύγκριση της δομής του SjGST με τη δομή των GSTs από θηλαστικά.

Οι δομικές διαφορές της θέσης δέσμευσης του ξενοβιοτικού υποστρώματος του ενζύμου SjGST σε σύγκριση με τις δομές GSTs των τάξεων  $\alpha$ ,  $\pi$  και  $\mu$  των θηλαστικών υποδεικνύει ότι το SjGST ανήκει σε μια καινούργια τάξη GST με ένα ευδιάκριτο διαφορετικό κέντρο δέσμευσης (McTigue *et al.*, 1995). Δομικά οι G- και H- θέσεις δέσμευσης του SjGST ομοιάζουν περισσότερο με αυτές του GST της  $\mu$  τάξης από αρουραίο (Σχήμα 1.16). Παρόλο που η G-θέση δέσμευσης του SjGST στην συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή δεν είναι κατελιημμένη, η ταυτότητα και η θέση όλων των καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με το GSH στην δομή του GST της  $\mu$  τάξης από αρουραίο είναι συντηρημένες στη δομή του SjGST. Αντιθέτως η θέση δέσμευσης των ξενοβιοτικών υποστρωμάτων στα δύο ένζυμα διαφέρει κατά πολύ.

Η κυριότερη διαφορά είναι η εισαγωγή οκτώ αμινοξικών καταλοίπων στην αμινοξική ακολουθία του GST της  $\mu$  τάξης από αρουραίο στην θέση που υποδεικνύεται με άσπρο βέλος στο Σχήμα 1.16. Στο SjGST η λούπα αυτή (μεταξύ της κλώνου  $\beta 5$  και  $\alpha 2$  έλικας) αντικαθίσταται με μια  $\beta$ -στροφή η οποία αυξάνει την έκθεση της θέσης δέσμευσης του ξενοβιοτικού προς τον διαλύτη. Αντιθέτως τα αρωματικά κατάλοιπα Trp206 και Tyr104 που βρίσκονται στη θέση αυτή στο SjGST μπλοκάρουν μερικώς την είσοδο της θέσης δέσμευσης του ξενοβιοτικού η οποία είναι περισσότερο ανοιχτή στο GST της  $\mu$  τάξης από αρουραίο (McTigue *et al.*, 1995). Οι δομικές αυτές διαφορές του SjGST σε σύγκριση με το GST της  $\mu$  τάξης από αρουραίο είναι ακόμα μεγαλύτερες εάν συγκριθούν με τις δομές GSTs της  $\alpha$  τάξης από άνθρωπο και της  $\pi$  τάξης από γουρούνι.

### 1.7. Εφαρμογές του SjGST.

Όπως αναφέραμε παραπάνω ο φυσιολογικός ρόλος του SjGST ως ένζυμο αποτοξίνωσης και στόχο εμβολίων και φαρμάκων είναι πολύ σημαντικός. Η ανάγκη για καινούργια, περισσότερο δραστικά και αποτελεσματικά φάρμακα έναντι των *Schistosoma spp* που προκαλεί 200.000 θανάτους ετησίως (Jao *et al.*, 2006) έχει στέψει ένα μεγάλο κομμάτι της επιστημονικής έρευνας στο ένζυμο SjGST. Με στόχο την

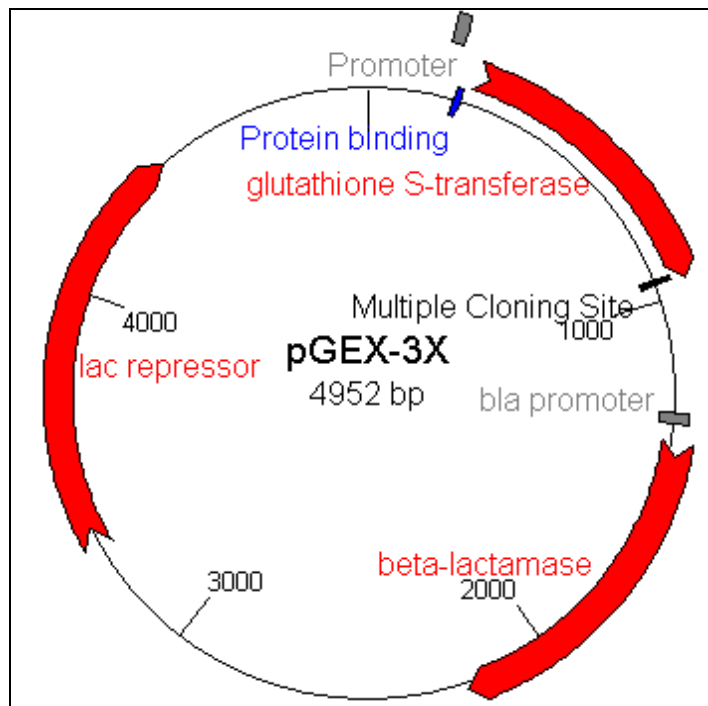


**Σχήμα 1.16.** Σύγκριση των θέσεων δέσμησης των υποστρωμάτων των ενζύμων *SjGST* και *GST* από αρουραίο της  $\mu$  τάξης. Ο ανθρακικός σκελετός του συμπλόκου *SjGST*-PZQ (κίτρινου χρώματος) παρουσιάζεται τοποθετημένος πάνω στην δομή του *GST* της  $\mu$  τάξης από αρουραίο (μωβ χρώματος) σε σύμπλοκο με το 9-(*S*-glutathionyl)-10-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene (GHDP, χρώματος άσπρου) με ανάλυση σε 2,2 Å (Ji *et al.*, 1994). Στο σχήμα επισημαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν στον σχηματισμό της G- και της H-θέσης δέσμησης των υποστρωμάτων. Είναι προφανές ότι μεταξύ των δομών των δύο ενζύμων υπάρχουν μεγαλύτερες διαφορές στα κατάλοιπα που σχηματίζουν την H-θέση δέσμησης από αυτά που βρίσκονται στην G-θέση δέσμησης. Με το άσπρο βέλος υποδεικνύεται η περιοχή της H-θέσης δέσμησης του ξενοβιοτικού που διαφέρει περισσότερο ανάμεσα στις δύο δομές. Οι δύο θέσεις δέσμησης του PZQ παρουσιάζονται με μπλε και πράσινο (McTigue *et al.*, 1995).

εύρεση νέων φαρμάκων και εμβολίων συνεχώς γίνονται νέες μελέτες και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις για την εύρεση νέων αναστολέων (Jao *et al.*, 2006) και την πλήρη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας της L-θέσης του ενζύμου (Cardoso *et al.*, 2003, Yassin *et al.*, 2003, 2004, Rufer *et al.*, 2005).

Μερικά από τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης *SjGST* είναι ότι έχει υψηλή σταθερότητα και διαλυτότητα, μπορεί να εκφραστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* καθώς και να καθαριστεί με μεγάλη ευκολία με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή με ακινιτοποιημένο GSH. Για όλους του παραπάνω λόγους το ένζυμο *SjGST* χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση και καθαρισμό συντηγμένων πρωτεϊνών (fusion proteins) (Namiki *et al.*, 2003). Το σύστημα «*GST*-συντηγμένων πρωτεϊνών» αποτελεί ένα ολοκληρωμένο σύστημα για την έκφραση, τον καθαρισμό και την απομόνωση-ανίχνευση συντηγμένων πρωτεϊνών που παράγονται ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli*. Το σύστημα

αποτελείται από τρία κύρια στοιχεία: τους πλασμιδιακούς φορείς pGEX, το χρωματογραφικό σύστημα καθαρισμού της GST-συντηγμένης πρωτεΐνης και το ενζυμικό σύστημα απομάκρυνσης του GST ενζύμου. Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να παράγουν υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικής έκφρασης γονιδίων σε σύντηξη με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης SjGST (Smith & Johnson, 1988). Στο Σχήμα 1.17 παρουσιάζεται ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-3X που αποτελεί έναν από τους πιο δημοφιλείς φορείς ετερόλογης έκφρασης. Οι συντηγμένες πρωτεΐνες μπορούν να καθαριστούν εύκολα με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή GSH- Sepharose 4B. Ο διαχωρισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης από τη SjGST επιτυγχάνεται με πρωτεάση ειδικής θέσης η οποία αναγνωρίζει ακολουθίες που βρίσκονται αμέσως μετά τη θέση κλωνοποίησης των pGEX πλασμιδίων. Οι συντηγμένες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ενζυμικές μεθόδους μέτρησης του GST ενζύμου. Το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα σε πολλές εφαρμογές όπως τη μοριακή ανοσολογία (Toye *et al.*, 1990), την παραγωγή εμβολίων (Fikrig *et al.*, 1990) και μελέτες αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA-πρωτεϊνών (Chittenden *et al.*, 1991).



**Σχήμα 1.17.** Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-3X. Στο σχήμα παρουσιάζεται η περιοχή που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη SjGST καθώς και η θέση υποκλωνοποίησης (Multiple Cloning Site) της επιθυμητής πρωτεΐνης.

### 1.8. Σκοπός της παρούσας μελέτης.

---

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της αναστολής του ενζύμου *SjGST* και γενικότερα της αλληλεπίδρασης με διάφορες ξενοβιοτικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στις κατηγορίες των φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και τριαζινοχρωστικών. Επιπροσθέτως, για τις ουσίες στις οποίες βρέθηκε ότι δεσμεύονται ισχυρά στο ένζυμο, έγινε κινητική ανάλυση έναντι των υποστρωμάτων GSH και CDNB ώστε να διαπιστωθεί αν η πρόσδεση τους γίνεται στις G- ή H-θέσεις δέσμευσης του ενζύμου έτσι ώστε να διαπιστωθεί και η ενδεχόμενη πρόσδεση τους στην L-θέση δέσμευσης του ενζύμου.



---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ &

ΓΕΩΠΛΙΣΜΟΣ

## 2.1. Υλικά

### 2.1.1. Βιολογικά υλικά

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασχηματισμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX, που εκφράζουν το ένζυμο GST από *Schistosoma japonica* αγοράστηκε από τον οίκο Pharmacia (Σουηδία). Επίσης ο πρωτεϊνικός μάρτυρας που χρησιμοποιήσαμε στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ήταν από την εταιρεία BioLabs (Αγγλία).

### 2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια και Kits.

Τα φυτοφάρμακα αγοράστηκαν από την εταιρεία Riedel de Haen (Γερμανία). Οι χρωστικές, η αλβουμίνη μόσχου (BSA) (fraction V), ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12KDa και το κρυσταλλικό γλουταθείο αγοράστηκαν από τον οίκο Sigma Co (St. Louis, Mo H.Π.Α.). Η VBAR (Vimafix Blue A-R) ήταν ευγενική προσφορά του Dr. J. Mazza (Vilmax S.A., Buenos Aires, Αργεντινή). Το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) (καθαρότητα 98%), το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, καθώς και ο επαγωγέας έκφρασης ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG) αγοράστηκαν από τον οίκο Genaxis (U.K.). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250) και το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη από την εταιρεία Scharlau (Ισπανία), η αγαρόζη από την εταιρεία Invitrogen (H.Π.Α.). Ο καθαρισμός του ενζύμου έγινε στον προσροφητή S-εξυλ GSH αγοράστηκε από τον οίκο Sigma Co (St. Louis, Mo H.Π.Α.). Τα ορθο-/παρα-/μετα-σουλφο- παράγωγα συνδέθηκαν από το Δρ. Πλατή Δημήτριο (Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Όλα τα άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τον οίκο Merck.

---

## 2.2. Εξοπλισμός

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους, του οίκου Hitachi (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 10mm) που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας.

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

Φυγόκεντροι Heraeus SEPATECH Contrifuge 17RS και Varifuge 20RS καθώς και η Heraeus Instruments Biofuge primo, χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή των κυττάρων.

Σύστημα υπερήχων Sonics & Materials Inc. Vibra Cell, χρησιμοποιήθηκε για το λύσιμο των κυττάρων.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου έγινε σε ψυχόμενη κάθετη συσκευή του οίκου Hoefler, Η.Π.Α., μοντέλο SE 600, συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500 x T (500 volt, 400 mA) επίσης του οίκου Hoefler, Η.Π.Α.

Κλίβανος αποστείρωσης 220V ΚΑΙ 5000W είναι από τον οίκο Αφοί Μ. Ανδριανόπουλοι Ο.Ε., Ελλάδα.

Αναλυτικοί ζυγοί AT261 DeltaRange, διακριτικής ικανότητας  $10^{-2}$  mg και PM2500 DeltaRange, διακριτικής ικανότητας  $10^{-3}$  g του οίκου METTLER.

---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer που περιείχαν 500ml θρεπτικού μέσου LB, η σύσταση του οποίου ήταν: 1% πεπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl. Επίσης περιείχαν και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml αντίστοιχα. Τυπικά η διαδικασία έχει ως εξής: θρεπτικό μέσο όγκου 500ml εμβολιάζεται με 50ml από ολονύκτια καλλιέργεια (επώαση 12-16h) κατάλληλα μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) με το πλασμίδιο pGEX και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C σε περιστροφικό αναδευτήρα (250rpm). Όταν η απορρόφηση δείγματος καλλιέργειας είναι 0,6-0,7 (600nm), προστίθεται ισοπρότυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοζίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1mM για να επάγει την έκφραση του ενζύμου. Ακολούθως, η καλλιέργεια επώαστηκε για επιπλέον 4h, όπου τα κύτταρα συλλέγονται (περίπου 3g υγρής πάστας κυττάρων / lit καλλιέργειας) με φυγοκέντριση στις 8000 rpm για 20min στους 4°C και διατηρούνται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **3.2. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.**

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (συνήθως παρουσία αντιβιοτικού) στους 37°C για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 250rpm. Από την καλλιέργεια αυτή 500μl μεταφέρονται σε erpendorf στο οποίο στη συνέχεια προστίθενται 500μl καθαρής γλυκερόλης 100% (v/v). Ακολουθεί καλή ανάμιξη με πολύ αργό ρυθμό, διότι μπορεί να προκληθεί οσμωτικό shock στα κύτταρα. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C.

### **3.3. Λύσιμο κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.**

Κύτταρα (τυπικά 1g) αιωρούνται σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,5, (τυπικά 3 ml). Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με επίδραση υπέρηχων 9 φορές για 15 δευτερόλεπτα κάθε φορά. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε παγόλουτρο (2-4°C). Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρείται στις (13000 rpm) για 5 min και το υπερκείμενο συλλέγεται.

### **3.4. Διαπίδυση.**

---

Το ενζυμικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι 1000-όγκων ρυθμιστικού διαλύματος 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7. Για τη διαπίδυση χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12kDa. Η διαδικασία διαρκεί 18-24 ώρες και πραγματοποιείται στους 4°C. Κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (<12 kDa).

### **3.5. Καθαρισμός του ενζύμου GST μέσω χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας ως προσροφητή S-εξυλ-GSH.**

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η GST δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο GSH της στήλης καθαρισμού, αφού αποτελεί ανάλογο του υποστρώματος της GSH. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν έχουν ως υπόστρωμα το γλουταθείο και συνεπώς δε δεσμεύονται.

Η διαδικασία που εφαρμόζεται για τον καθαρισμό του ενζύμου στον προσροφητή είναι η εξής: ο προσροφητής, όγκου 1ml, εξισορροπείται με 20ml ρυθμιστικού διαλύματος 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7, και φορτώνεται το ενζυμικό εκχύλισμα (3ml, 17,36 u/ml). Αφού παραλάβουμε το εκχύλισμα, ο προσροφητής πλένεται με 30ml ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη προσροφημένες και οι χαλαρά δεσμευμένες πρωτεΐνες, τα οποία συλλέγουμε αρχικά σε τρία κλάσματα των 3 mL, ενώ τα υπόλοιπα 21 ml στο ίδιο falcon. Στη συνέχεια, το ένζυμο εκλούεται με 20ml διαλύματος GSH, συγκέντρωσης 10mM και pH 7, διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης σε δέκα κλάσματα των 2 ml. Το ένζυμο παραλαμβάνεται σε κλάσματα του 1ml. Σε κάθε στάδιο καθαρισμού του ενζύμου γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του GST. Η πρωτεΐνη υπολογίζεται ποσοτικά με την μέθοδο Bradford.

### **3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04mg/ml έως 0,20mg/ml (40-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

---

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Η χρωστική (100mg) διαλύεται σε 100ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100ml 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 ώρες. Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης σε 950μl του διαλύματος αυτού προστίθενται 50μl πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25°C για 20-35 min και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595nm, έχοντας ως αναφορά διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας σαν πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10μg) αλβουμίνης από ορό μόσχου (fraction V).

### **3.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.**

#### **3.7.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).**

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων, που αποτελούνταν από:

**A)** Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων : Tris (0,025M) – γλυκίνη (0,192M), SDS (0,1% w/v), pH 8,3.

**B)** Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού : Tris/HCl (3M), pH 8,8.

**Γ)** Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης : Tris/HCl (0,5M), pH 6,8.

**Δ)** Διάλυμα ακρυλαμίδιου: ακρυλαμίδιο (30,0g, 0,42mol) και N, N' – μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (0,8g, 5,2mmol) διαλυμένα σε 100ml νερού.

---

E) Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων : Tris/HCl (0,125M), pH 6,8, SDS (4% w/v), γλυκερόλης (20% v/v) και β-μερκαπτοαιθανόλη (10% v/v)

**Στ)** Διάλυμα SDS (10% w/v)

**Ζ)** Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (1,5% w/v)

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού και επιστοιβαξης με περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 12,5%.

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής επιστοιβαξης και διαχωρισμού είναι η ακόλουθη: Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875μl) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (70μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2937,5μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (2937,5μl) και στη συνέχεια απαερώνεται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 min. Μετά την απαέρωση, προσθέτονται TEMED (6,25μl) και υπερθειϊκό αμμώνιο (1,5ml), το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι (1,5mm πάχος και 12cm βάθος). Η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με διάλυμα βουτανόλης κορεσμένης με νερό και αφήνεται να πολυμεριστεί (1 ώρα, 20-25°C). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, απομακρύνεται το διάλυμα της βουτανόλης και αφού ξεπλυθεί με νερό η επιφάνεια της πηκτής, εισάγεται η πηκτή επιστοιβαξης, η οποία παρασκευάζεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξης (625μl), αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (625μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450μl) και στη συνέχεια απαερώνεται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 min. Μετά την απαέρωση, προσθέτεται TEMED (6,25μl) και υπερθειϊκό αμμώνιο (1,0ml), το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι (1,5 mm πάχος και 4 cm βάθος). Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε ~30 min (25°C).

**3.7.2. Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.**



---

Κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού δείγματος (γενικά 50-100μg) διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (~10 μl) όπου θερμαίνεται στους 75-100°C. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ως μάρτυρας η χρωστική μπλε της βρωμοκρεζόλη (0,02% w/v). Ακολούθως το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται (20-25°C) σε σταθερή ένταση 30 mA για κάθε πηκτή, για χρόνο 4- 6 ώρες.

### 3.7.3. Βαφή με Coomassie Brilliant blue R-250.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από ηλεκτροφόρηση για την βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών. Η διαδικασία έχει ως εξής: μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40% v/v), οξικό οξύ (7% v/v) και Coomassie Brilliant blue R-250 (0,025-0,1% w/v) όπου και επώαζεται για 10 ώρες περίπου. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται μετά από επώαση για 5 ώρες περίπου στο καθένα από τα παρακάτω δύο υδατικά διαλύματα που περιέχουν: α) μεθανόλη (50% v/v) και οξικό οξύ (10% v/v) και β) μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7% v/v).

### 3.8. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST.

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



Το μίγμα επώασης έχει συνολικό όγκο 1ml και περιέχει 0,1M ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, 2,5mM GSH, 1mM CDNB καθώς και GST (έως 0,02 units). Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή 1μM CDNB σε GS-CDNB ανά λεπτό στους 37°C. Για τον ποσοτικό υπολογισμό του GS-CDNB χρησιμοποιείται σαν συντελεστής μοριακής απόσβεσης η τιμή 9,6 l/ mM·cm.

### 3.9. Προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις.

---

Η μέθοδος βασίζεται στην αναστολή της αντίδρασης CDNB-GSH του ενζύμου. Το μίγμα επώασης έχει τελικό όγκο 1ml, στο οποίο περιέχονται 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5 ρυθμιστικό διάλυμα, 2,5mM GSH, 1mM CDNB και είτε 5μM χρωστικής (διαλυμένης σε ddH<sub>2</sub>O) και GST, είτε 0,1mM ξενοβιοτικής ένωσης από τις υπόλοιπες ξενοβιοτικές ενώσεις (διαλυμένης σε ακετόνη, σε ddH<sub>2</sub>O ή σε 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7) και GST. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα που όμως δεν περιέχει το ένζυμο. Λαμβάνεται απορρόφηση στα 340nm.

### **3.10. Αδρανοποίηση του ενζύμου από τη χρωστική VBAR.**

Μελετήθηκε η απενεργοποίηση του ενζύμου από τη χρωστική VBAR για διάφορες συγκεντρώσεις της (2,5-15μM). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στους 25°C για 1,5h σε 20mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 7 τελικού όγκου 1ml που περιέχει κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης και διάφορες συγκεντρώσεις χρωστικής. Κατά τη διάρκεια των επώασεων παίρνουμε δείγμα και γίνεται έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας (παράγραφος 3.8).

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις που το μίγμα επώασης περιείχε εκτός από τα παραπάνω και διάφορες ουσίες που αποτελούν παρεμποδιστές του ενζύμου όπως το S-p-νιτροβενζυλ-γλουταθείο και τα ξενοβιοτικά endosulphan, DDT και dieldrin. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η απενεργοποίηση του ενζύμου από την χρωστική VBAR παρουσία 1mM και 0,1mM S-p-νιτροβενζυλ-γλουταθείου. Το μίγμα επώασης (25°C) περιείχε σε τελικό όγκο 1ml, 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 7, ένζυμο, 10μM VBAR, 1mM ή 0,1mM S-p-νιτροβενζυλ-γλουταθείο. Επίσης, μελετήθηκε με την ίδια διαδικασία η απενεργοποίηση του ενζύμου από την VBAR χρωστική παρουσία των ξενοβιοτικών endosulphan, DDT και dieldrin (0,1mM). Το μίγμα επώασης (25°C) περιείχε σε τελικό όγκο 1ml, 20mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 7, ένζυμο, 10μM VBAR και 0,1mM από τα ξενοβιοτικά.

### **3.11. Κινητική ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής του ενζύμου GST.**

Διεξήχθει κινητική ανάλυση, στην αρχή με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση GSH και σταθερή συγκέντρωση CDNB (1mM). Έπειτα με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση CDNB

---

(προστίθονταν αιθανόλη  $V_{αιθ}=50\mu\text{l}-V_{\text{CDNB}}$ ) και σταθερή συγκέντρωση GSH (2,5mM). Η κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,5, έως τελικού όγκου 1ml. Επίσης, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση GSH και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση Endosulphan (0-0,1mM), καθώς και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση CB3GA (0-0,075 $\mu\text{M}$ ). Έπειτα, με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση CDNB (προστίθονταν αιθανόλη  $V_{αιθ}=50\mu\text{l}-V_{\text{CDNB}}$ ) και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση endosulphan (0-0,06mM), καθώς και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση CB3GA (0-0,075 $\mu\text{M}$ ). Η κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, έως όγκου 1 ml. Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης. Λαμβάνεται απορρόφηση στα 340nm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα που όμως δεν περιέχει το ένζυμο.

### **3.12. Προσδιορισμός του $\text{IC}_{50}$ της αναστολής του ενζύμου από ξеноβιοτικές ενώσεις.**

Αναλύθηκαν τα αποτελέσματα αναστολής του ενζύμου με μεταβαλλόμενες συγκέντρωσεις DDT (0-0,15mM), endosulphan(0-0,15mM), dieldrin(0-0,15mM), CB3GA(0-50 $\mu\text{M}$ ), VBAR (0-6 $\mu\text{M}$ ), βρωμαμινικού οξέως (0-40 $\mu\text{M}$ ), ορθο-/παρα-/μετα-σουλφονυλ παραγώγων (0-200 $\mu\text{M}$ ). Το μίγμα επώασης έχει τελικό όγκο 1ml, στο οποίο περιέχονται 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5 ρυθμιστικό διάλυμα, 2,5mM GSH, 1mM CDNB. Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης. Λαμβάνεται απορρόφηση στα 340nm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται όμοιο μίγμα που όμως δεν περιέχει το ένζυμο.

### **3.13. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.**

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής κινητικής έγινε χρήση του προγράμματος Grafit 4 (Erithacus Software Limited, Version 4.06), για τη σχεδίαση του συντακτικού τύπου των χημικών ενώσεων που παρουσιάζονται χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ChemSketch (Advanced Chemistry Development Inc.).

---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1. Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου *SjGST* σε *E. coli* BL21(DE3).

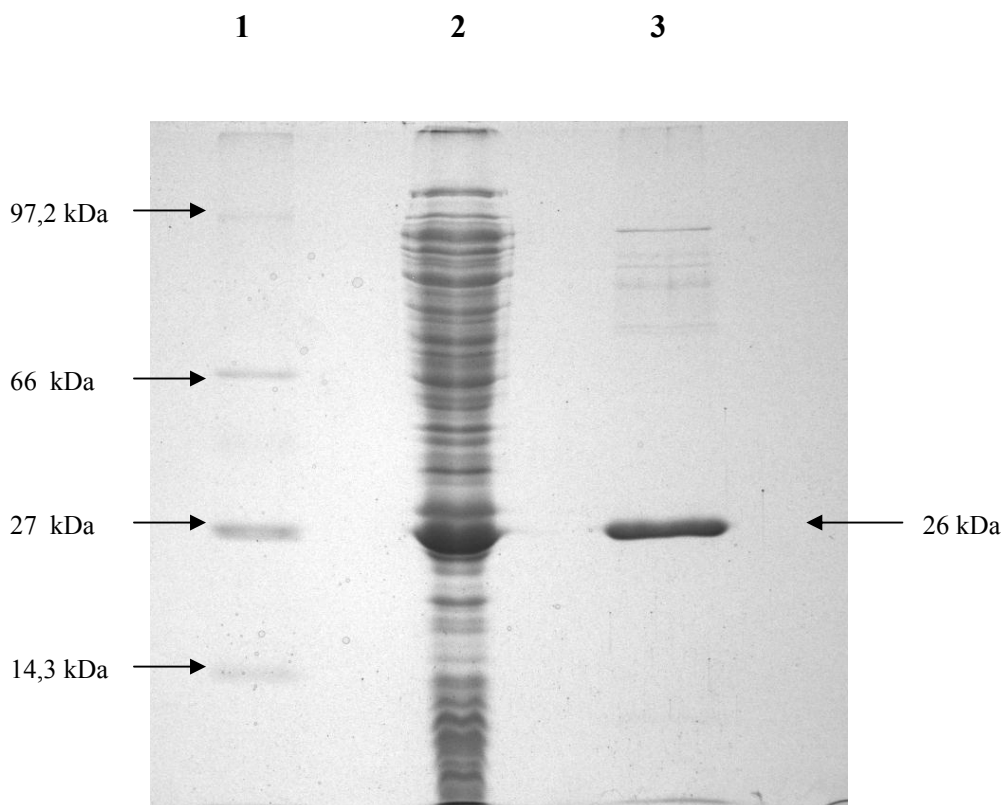
Το ένζυμο *SjGST* εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) (Παράγραφος 3.1). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος (Παράγραφος 3.3). Ακολούθησε δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας με φωτομετρικό προσδιορισμό του ενζύμου (Παράγραφος 3.8) και μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Παράγραφος 3.6).

#### 4.2. Καθαρισμός του ενζύμου *SjGST*, μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή S-εξυλ-GSH.

Ενζυμικό διάλυμα *SjGST* (3ml, 29,16U/ml, 74,14mg πρωτεΐνης) εξισορροπημένο σε 10ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 20mM, pH 7, φορτώνονται σε προσροφητή S-εξυλ-GSH (1ml). Οι μη-προσροφημένες ή χαλαρά προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με 30ml ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης. Το ένζυμο εκλούεται με 20ml GSH 10mM, pH 7 διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (Παράγραφος 3.5). Τα αποτελέσματα καθαρισμού των ενζύμων φαίνονται στον (Πίνακας 4.1). Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος καθαρότητας του ενζύμου *SjGST* με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS για πριν και μετά τον καθαρισμό του ενζύμου η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1.

**Πίνακας 4.1.** Αποτελέσματα καθαρισμού του ενζύμου *SjGST* σε χρωματογραφική στήλη S-εξυλ-GSH.

<u>Στάδιο</u>	<u>Όγκος</u> (ml)	<u>Ενζυμικές</u> <u>μονάδες (Units)</u>	<u>Πρωτεΐνη</u> (mg)	<u>Ειδ. δραστι-</u> <u>κότητα</u> (Units/mg)	<u>Καθαρισμός</u> (φορές)	<u>Απόδοση</u> (%)
Ακατέργαστο εκχύλισμα	3	87,49	74,14	1,18	-	100
Έκλουση (χρωματο- γραφία συγγένειας)	20	62,98	4,84	13,01	11,02	77,55



**Σχήμα 4.1** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (10% w/v πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie blue R-250. **Θέση 1:** μάρτυρας μοριακής μάζας (Protein Market Board Range), **θέση 2:** ακατέργαστο εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων BL21(DE3) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pGEX στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο SjGST, **θέση 3:** καθαρό ένζυμο SjGST μετά από χρωματογραφία συγγένειας με προσροφητή S-εξυλ-GSH.

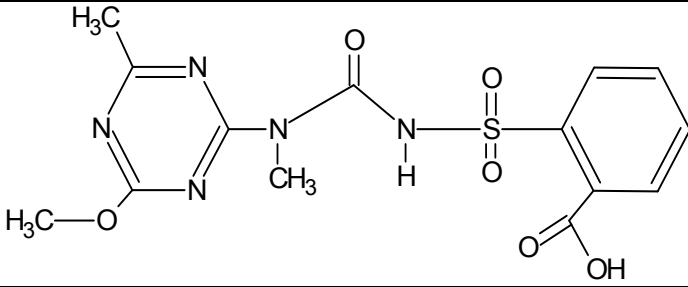
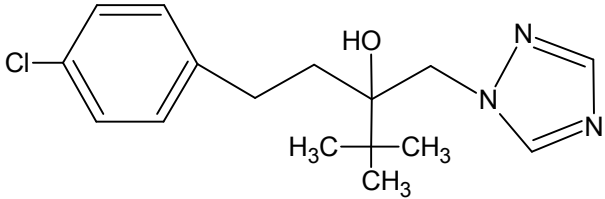
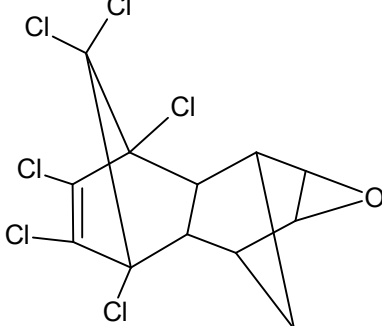
#### 4.3. Μελέτη της αναστολής του ενζύμου από ξενοβιοτικές ενώσεις.

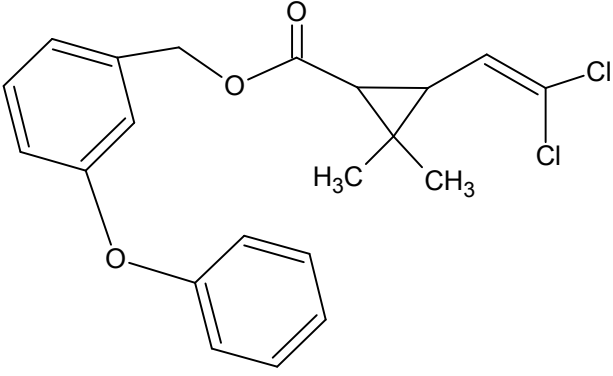
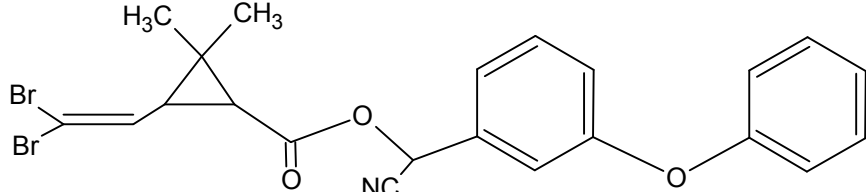
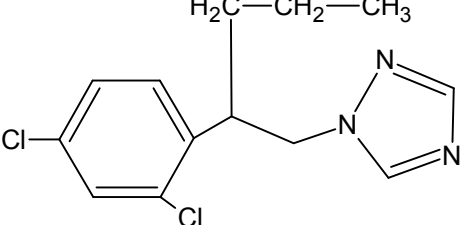
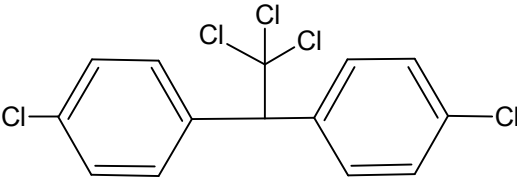
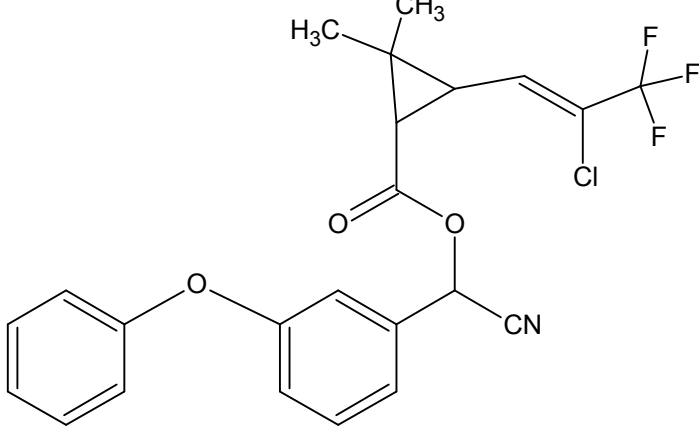
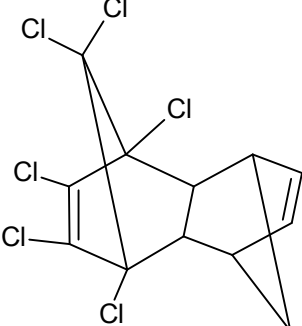
Αρχικά, για να ελεγχθεί η δραστηριότητα του ενζύμου, γίνεται μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χωρίς να προστεθεί ξενοβιοτική ένωση. Στον Πίνακα 4.2 δίνονται οι ξενοβιοτικές ενώσεις και ο συντακτικός τους τύπος, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι δίνεται ο συντακτικός τύπος κάποιων αντιπροσωπευτικών χρωστικών κάθε χρώματος, εφόσον γνωρίζουμε ότι είναι συγγενικής χημικής δομής με πολύ μικρές διαφοροποιήσεις από τις χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθεί η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία και απουσία κάθε ξενοβιοτικής ένωσης. Οι ξενοβιοτικές ενώσεις διαλύθηκαν σε ddH<sub>2</sub>O, σε ακετόνη ή σε 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7, έχοντας τελική συγκέντρωση είτε 5μM για

τις τριαζινο-χρωστικές που μελετήθηκαν (Σχήμα 4.2), είτε 0,1mM για τις υπόλοιπες ξενοβιοτικές ενώσεις (γεωργικά φάρμακα, Σχήμα 4.3). Όσον αφορά τις τριαζινο-χρωστικές (Σχήμα 4.2), παρατηρήθηκε ότι οι περισσότερες από αυτές εμφάνισαν αυξημένη αναστολή για το ένζυμο. Η ανθρακινωνική-τριαζινο-χρωστική Cibacron blue 3GA (CB3GA), δεδομένου ότι αποτελεί ένα μόριο με μεγάλες εφαρμογές στην ενζυμολογία και βιοχημεία γενικότερα, αποτέλεσε τον πρώτο στόχο στην παρούσα μελέτη και στη συνέχεια η έρευνα θα εστιαστεί στη χρωστική αυτή.

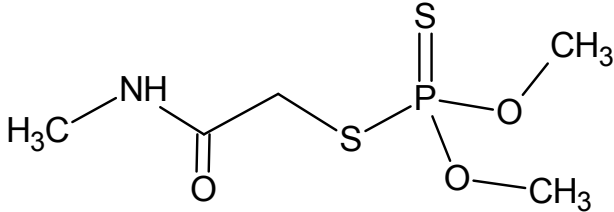
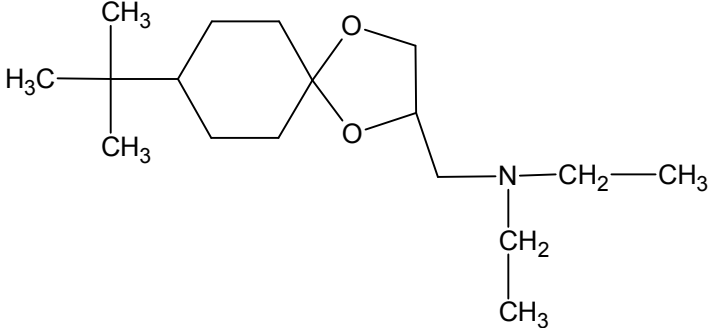
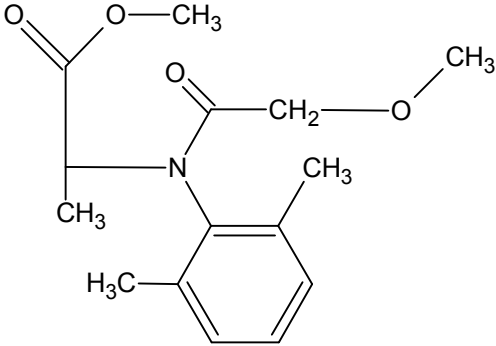
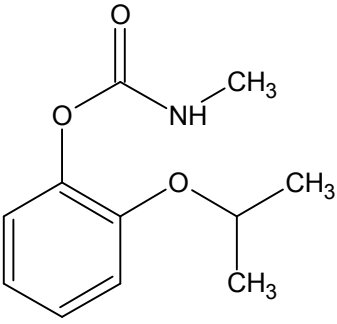
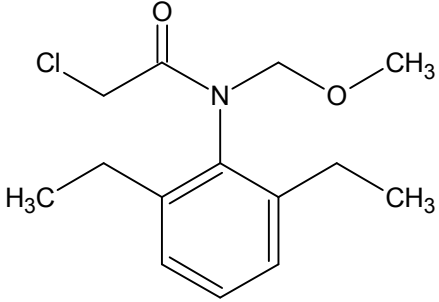
Τα αποτελέσματα της μελέτης αλληλεπίδρασης των γεωργικών φαρμάκων με το ένζυμο (Σχήμα 4.3) έδειξε ότι μόνο τρία από αυτά (DDT, endosulphan και dieldrin) εμφάνισαν αξιοσημείωτη αναστολή (~ 40 %) της ενζυμικής δραστηριότητας. Συνεπώς οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

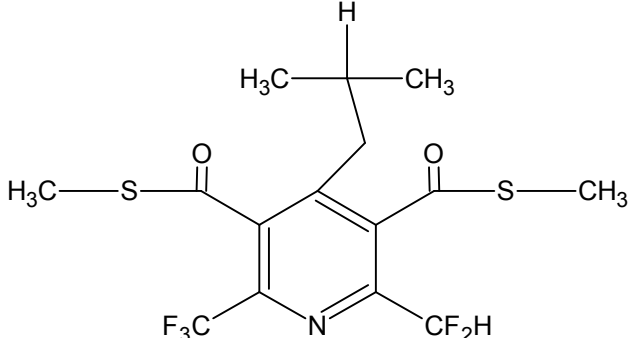
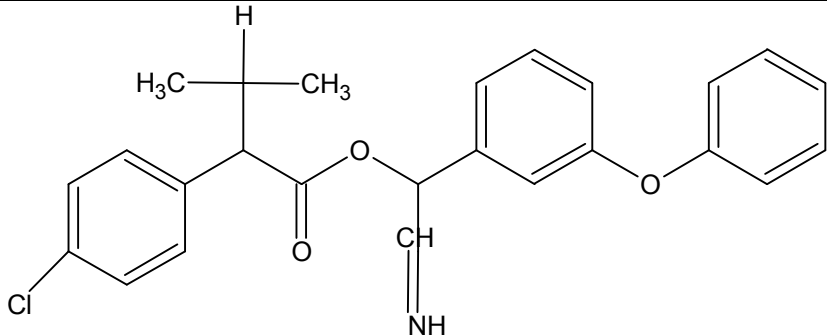
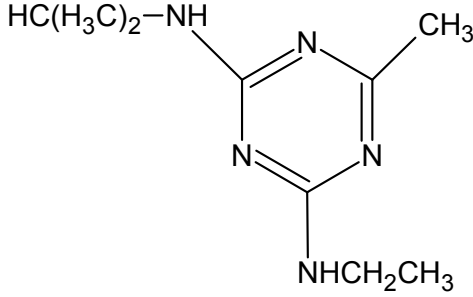
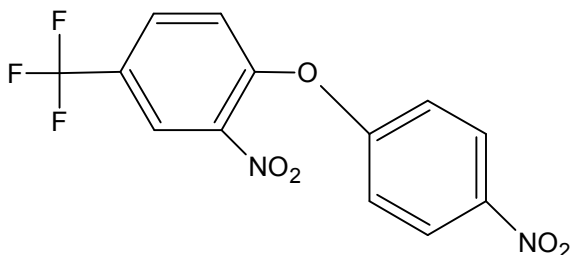
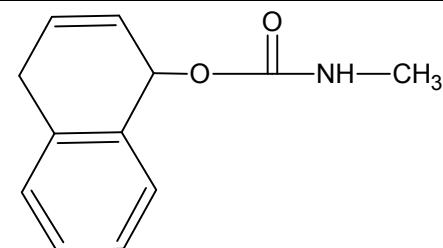
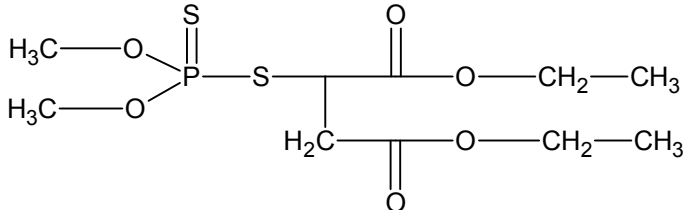
**Πίνακας 4.2.** Ξενοβιοτικές ενώσεις και ο συντακτικός τους τύπος.

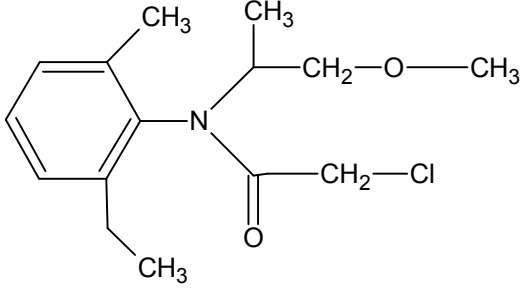
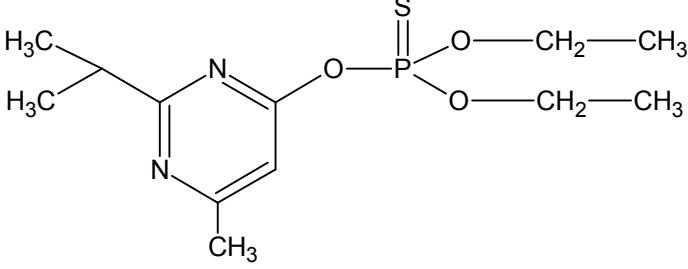
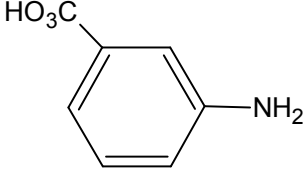
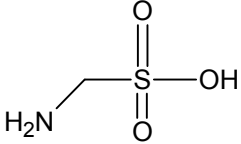
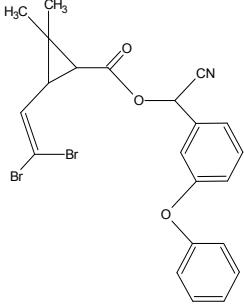
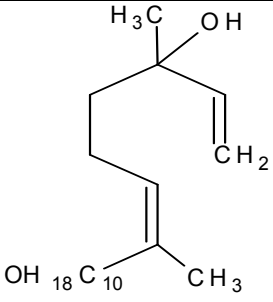
<u>Ξενοβιοτική ένωση</u>	<u>Συντακτικός τύπος</u>
<u>Tribenuroil methyl</u>	
<u>Tebucenazole</u>	
<u>Dieldrin</u>	

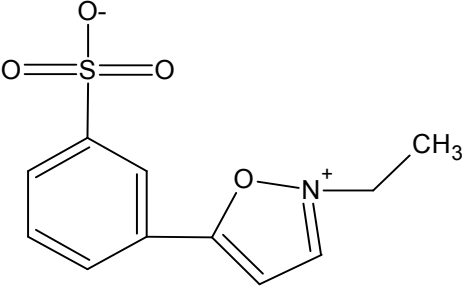
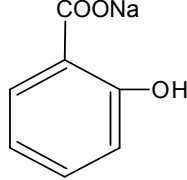
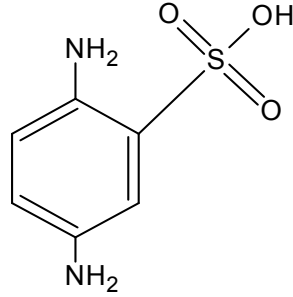
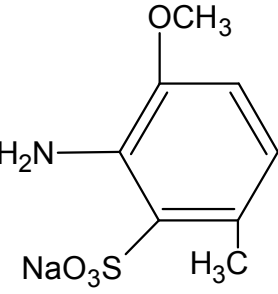
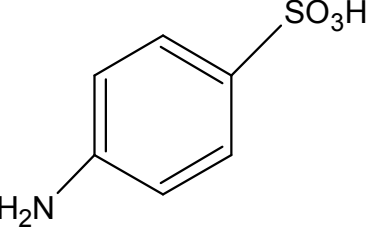
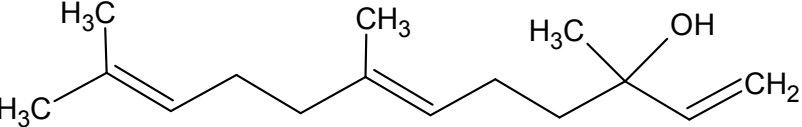
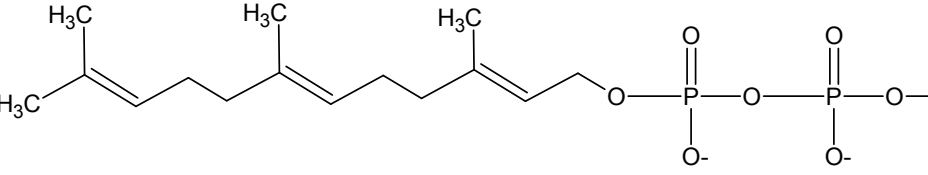
<p><b><u>Permethrin</u></b></p>	
<p><b><u>Deltamethrin</u></b></p>	
<p><b><u>Perconazole</u></b></p>	
<p><b><u>DDT</u></b></p>	
<p><b><u>Lam. Cyhalothrin</u></b></p>	
<p><b><u>Aldrin</u></b></p>	

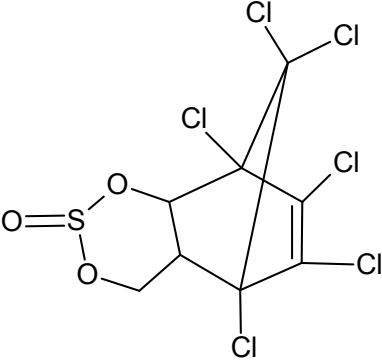
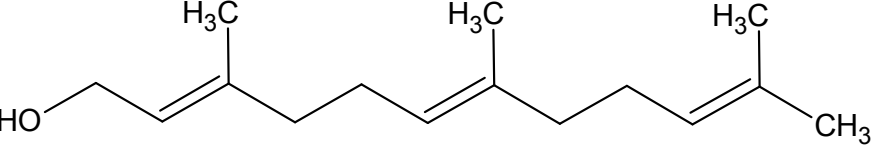
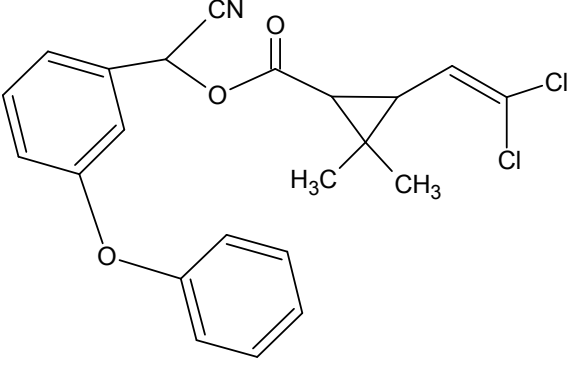
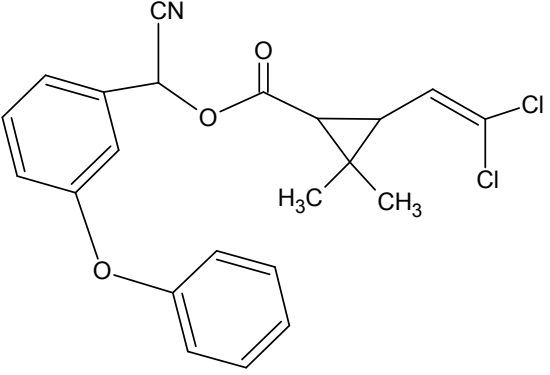
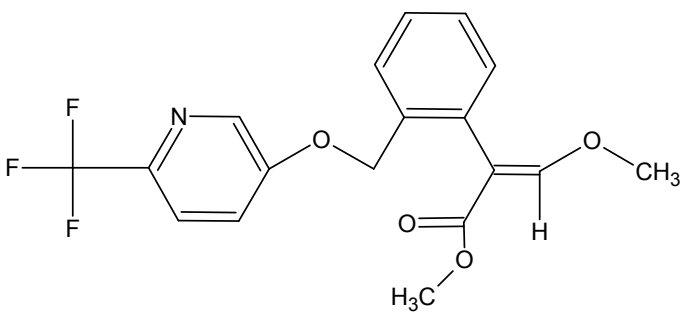
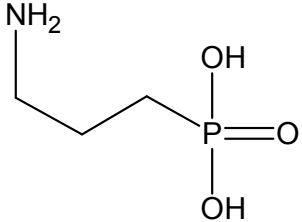


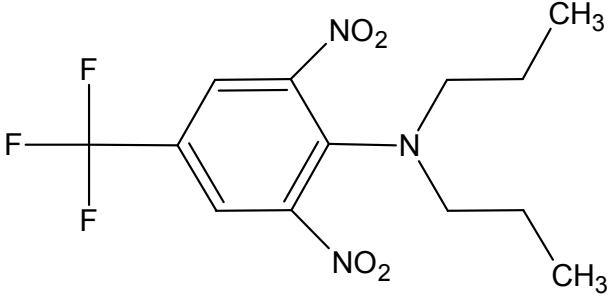
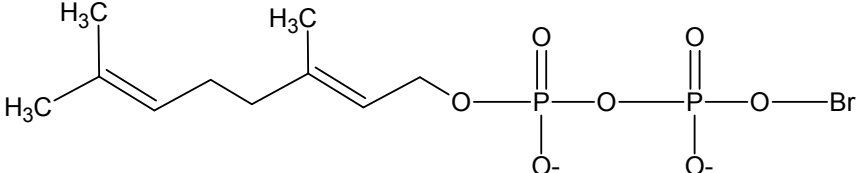
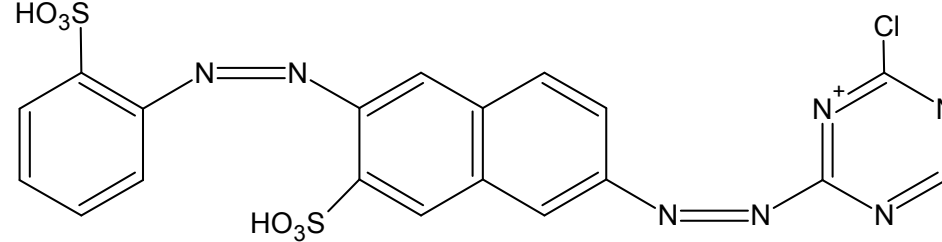
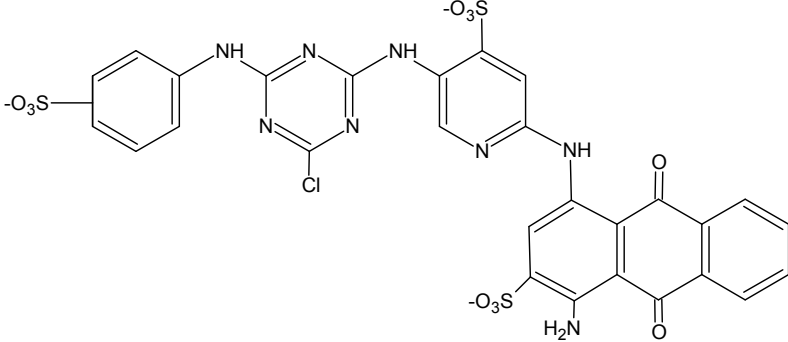
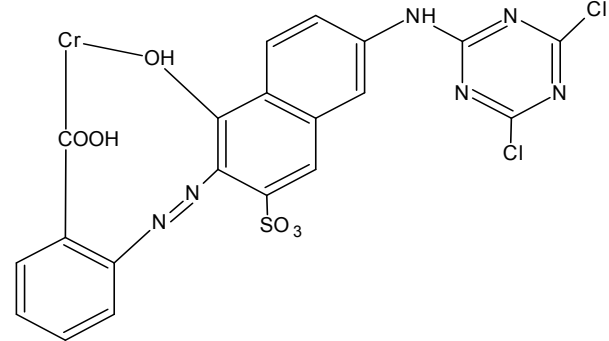
<p><b><u>Dimethoate</u></b></p>	
<p><b><u>Spiroxamine</u></b></p>	
<p><b><u>Metalaxyl-M</u></b></p>	
<p><b><u>Propoxur</u></b></p>	
<p><b><u>Alachlor</u></b></p>	

<p><b><u>Diuron</u></b></p>	
<p><b><u>Fervalerate</u></b></p>	
<p><b><u>Atrazine</u></b></p>	
<p><b><u>Fluorodifen</u></b></p>	
<p><b><u>Carbaryl</u></b></p>	
<p><b><u>Malathion</u></b></p>	

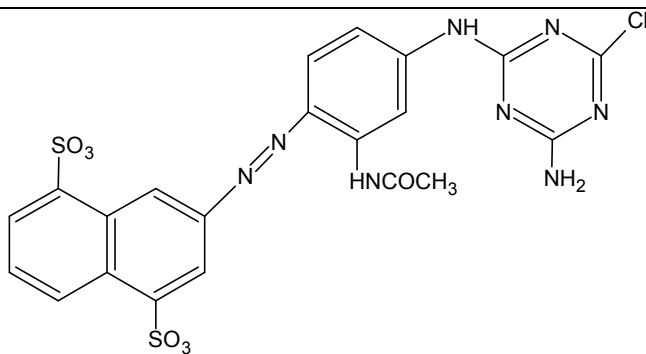
<p><b><u>Metolachlor</u></b></p>	
<p><b><u>Diazinon</u></b></p>	
<p><b><u>3-Aminobenzenesulfonic acid</u></b></p>	
<p><b><u>Aminomethanesulfonic acid</u></b></p>	
<p><b><u>Deltamethrin</u></b></p>	
<p><b><u>L-Linalool</u></b></p>	

<p><b><u>N-Ethyl-5-phenylisoxazolium 3'-sulfonate</u></b></p>	
<p><b><u>Sodium salicylate</u></b></p>	
<p><b><u>2,5-Diaminobenzenesulfonic acid</u></b></p>	
<p><b><u>Aniline-2-sulfonic acid</u></b></p>	
<p><b><u>Sulfanilic acid</u></b></p>	
<p><b><u>Trans-nerolidol</u></b></p>	
<p><b><u>Trans-trans-farnesyl pyrophosphate bromide</u></b></p>	

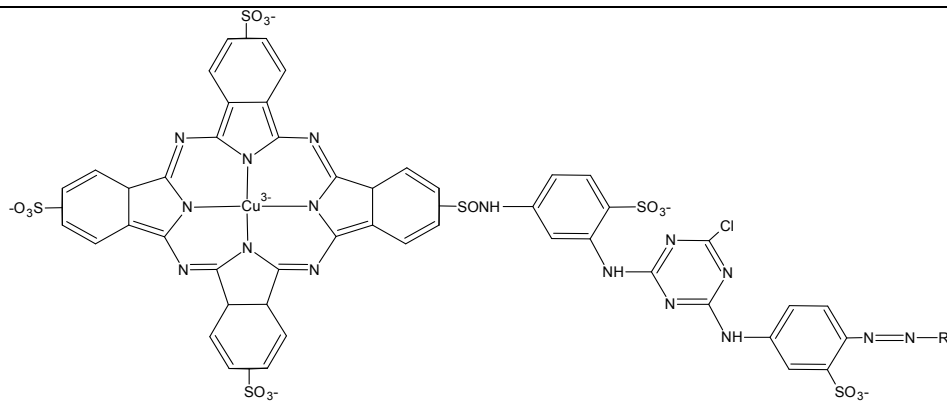
<p><b><u>Endosulphan</u></b></p>	
<p><b><u>Trans-trans-farnesol</u></b></p>	
<p><b><u>a-cypermethrin</u></b></p>	
<p><b><u>b-cypermethrin</u></b></p>	
<p><b><u>Aroxystrobin</u></b></p>	
<p><b><u>3-Aminopropylphosphonic acid</u></b></p>	

<p><b><u>Trifluralin</u></b></p>	
<p><b><u>Geranyl pyrophosphate bromide</u></b></p>	
<p><b><u>Brilliant Orange MG Cl</u></b></p>	
<p><b><u>Blue H-B</u></b></p>	
<p><b><u>Brown MX-5BR</u></b></p>	

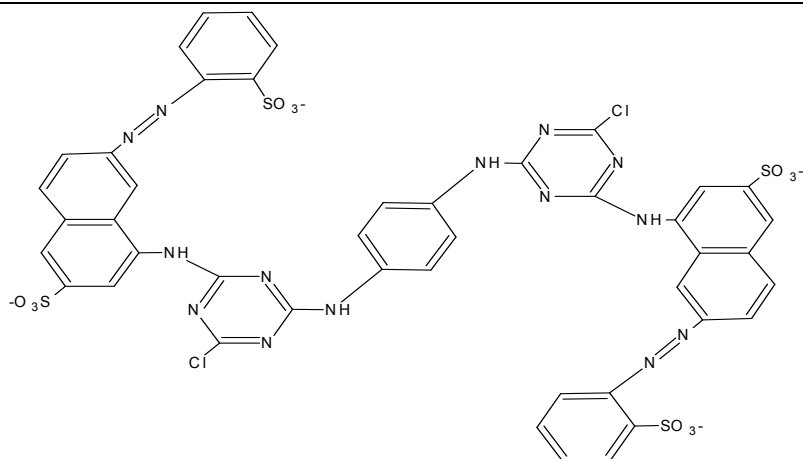
**Yellow H-A**



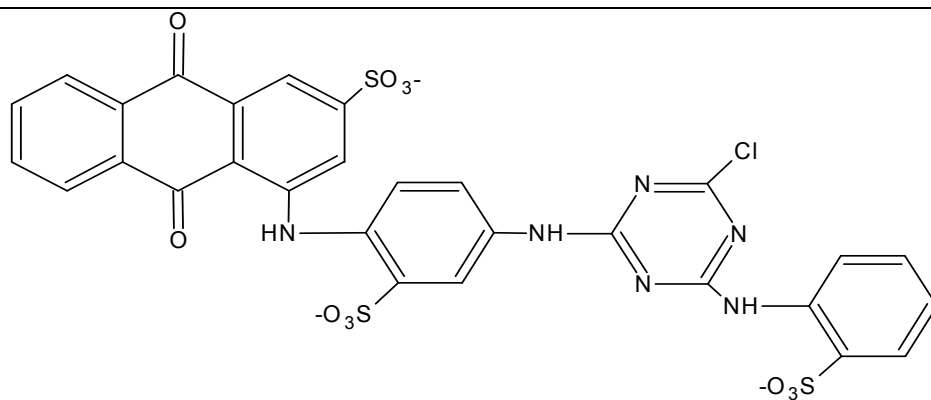
**Green H-4G**

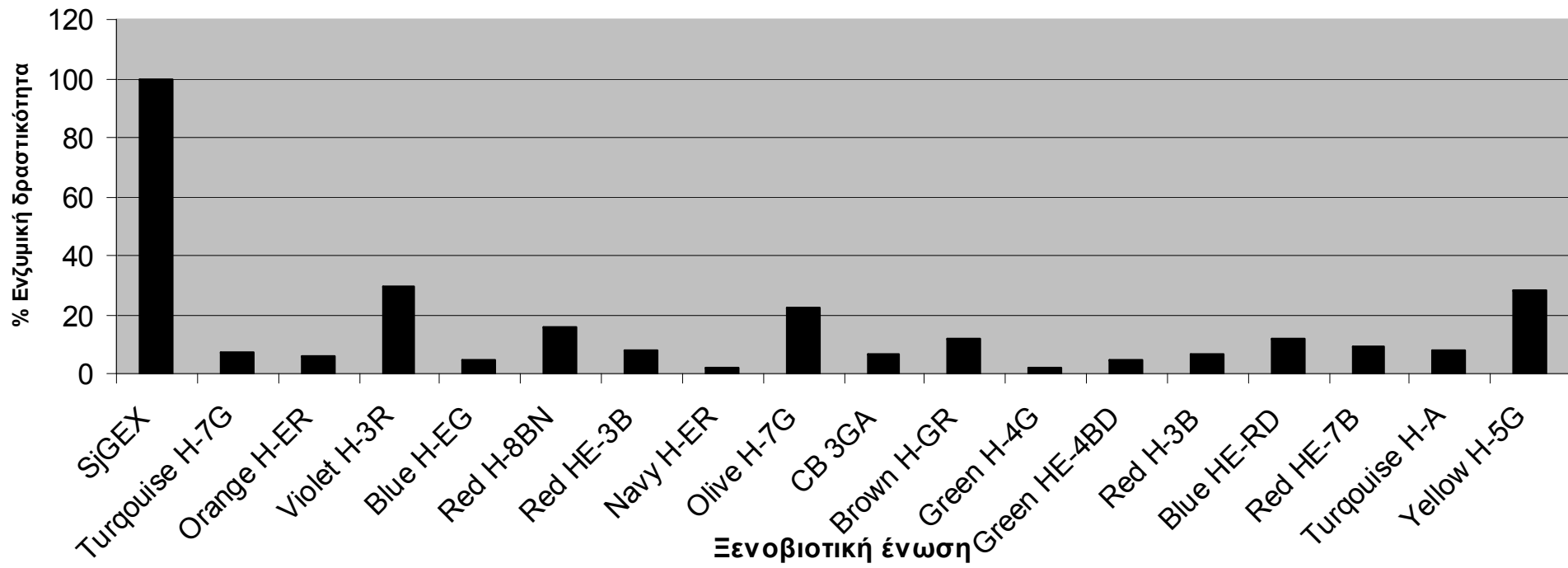


**Red HE-3B**



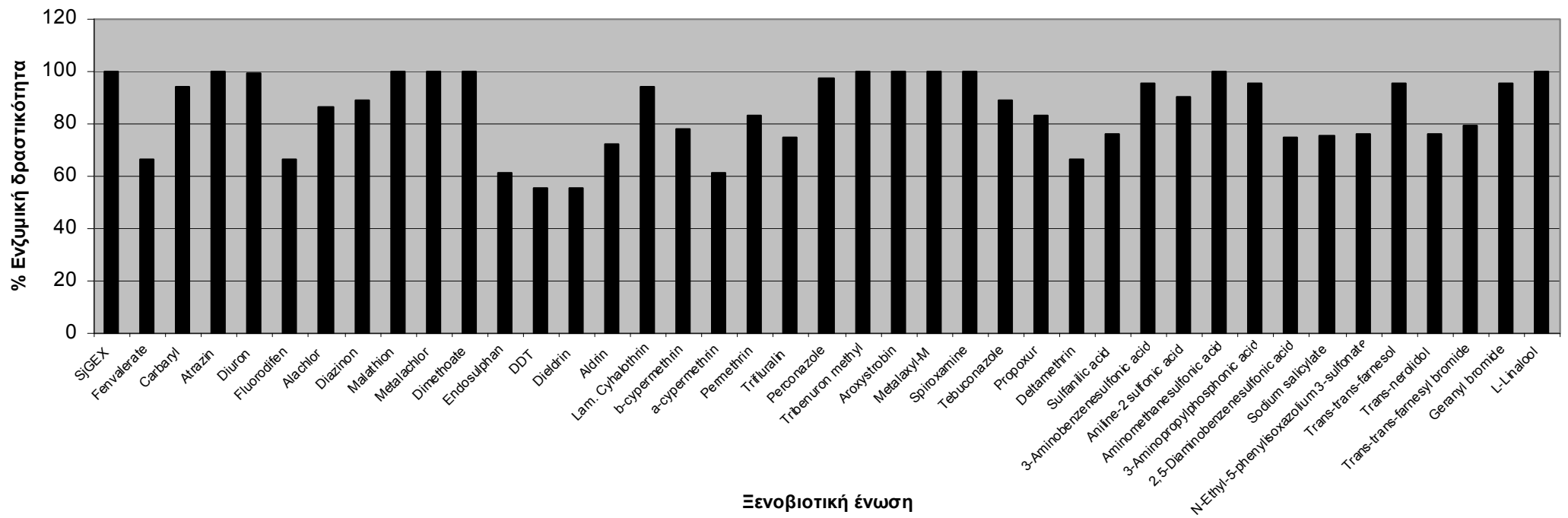
**Cibacron blue 3GA**





**Σχήμα 4.2** Γραφική παράσταση % ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία τριαζινο-χρωστικών. Ως 100% λαμβάνεται η ενζυμική δραστηριότητα απουσία ξενοβιοτικών ενώσεων.





**Σχήμα 4.3** Γραφική παράσταση % ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία διαφόρων ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων ή μυκητοκτόνων ως ξενοβιοτικών ενώσεων. Ως 100% λαμβάνεται η ενζυμική δραστηριότητα απουσία ξενοβιοτικών ενώσεων.

---

#### 4.4. Μελέτη της αναστολής του ενζύμου από τη VBAR.

Για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της χρωστικής CB3GA με το ένζυμο, αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη της συμπεριφοράς του ενζύμου με το δραστικό ανάλογο VBAR. Η VBAR είναι διχλωρο-τριαζινο-χρωστική και εμφανίζει ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα. Αυτό έχει σαν συνέπεια να συμπεριφέρεται σαν μη-αντιστρεπτός αναστολέας σε πολλά ένζυμα και πρωτεΐνες. Αρχικά μελετήθηκε κινητικά η αλληλεπίδραση VBAR-SjGST. Η χημική αντίδραση μεταξύ ενός ενζύμου και ενός μη αντιστρεπτού αναστολέα (π.χ. της χρωστικής VBAR) περιγράφεται μαθηματικά ως εξής:



όπου  $E$  και  $I$  είναι το ελεύθερο ένζυμο και ο αναστολέας αντίστοιχα,  $E \cdot I$  είναι το αντιστρεπτό σύμπλοκο μεταξύ ενζύμου και αναστολέα (ενδιάμεσο σύμπλοκο του τύπου Michaelis),  $E - I$  είναι το ομοιοπολικά τροποποιημένο ένζυμο από τον αναστολέα,  $K_D$  είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου  $E \cdot I$  και  $k_3$  είναι η μέγιστη ταχύτητα αδρανοποίησης. Από την σχέση (1) και δεχόμενοι συνθήκες σταθερής κατάστασης των Briggs & Haldane μπορούμε να προχωρήσουμε στην παραγωγή κινητικών εξισώσεων που περιγράφουν το φαινόμενο, υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιούμε αρκετά μεγάλη περίσσεια αναστολέα έναντι της συγκέντρωσης του ενζύμου ( $[I] \gg [E]$ ), ώστε πρακτικά η συγκέντρωση του αναστολέα να παραμένει σταθερή:

$$k_{obs} = \frac{k_3[D]}{K_D + [D]} \quad (2)$$

όπου  $k_{obs}$  είναι η παρατηρούμενη ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου από το μη-αντιστρεπτό αναστολέα, και  $[D]$  η συγκέντρωση του μη-αντιστρεπτού αναστολέα (π.χ. δραστική χρωστική).

Η παρατηρούμενη ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου ( $k_{obs}$ ) προσδιορίζεται γραφικά από τη γραφική παράσταση του  $\log(\% \text{ παραμένουσα ενζυμική$

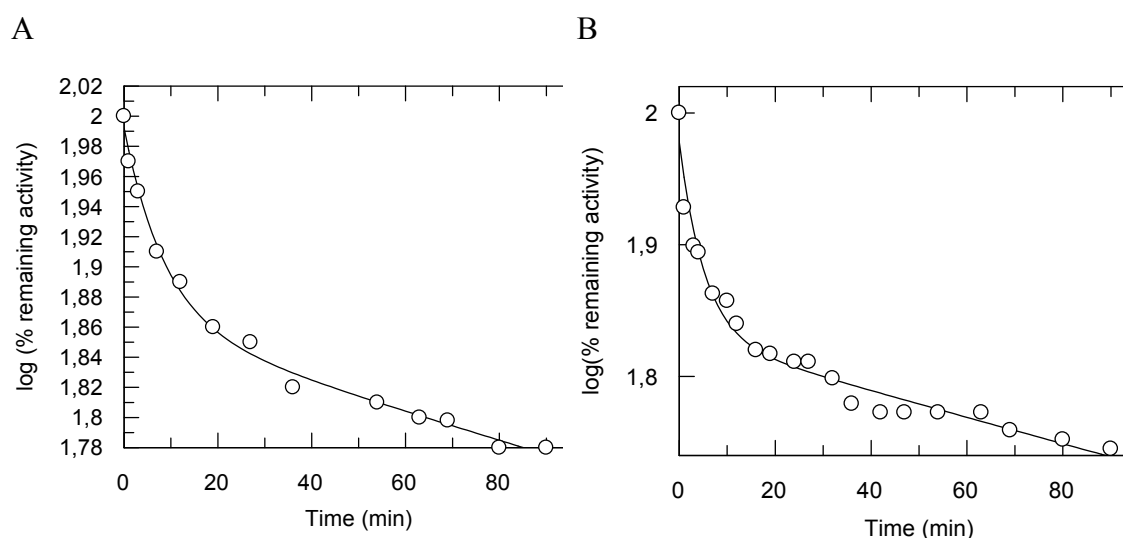
δραστηκότητα) έναντι του χρόνου  $t$  (min) σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση χρωστικής:

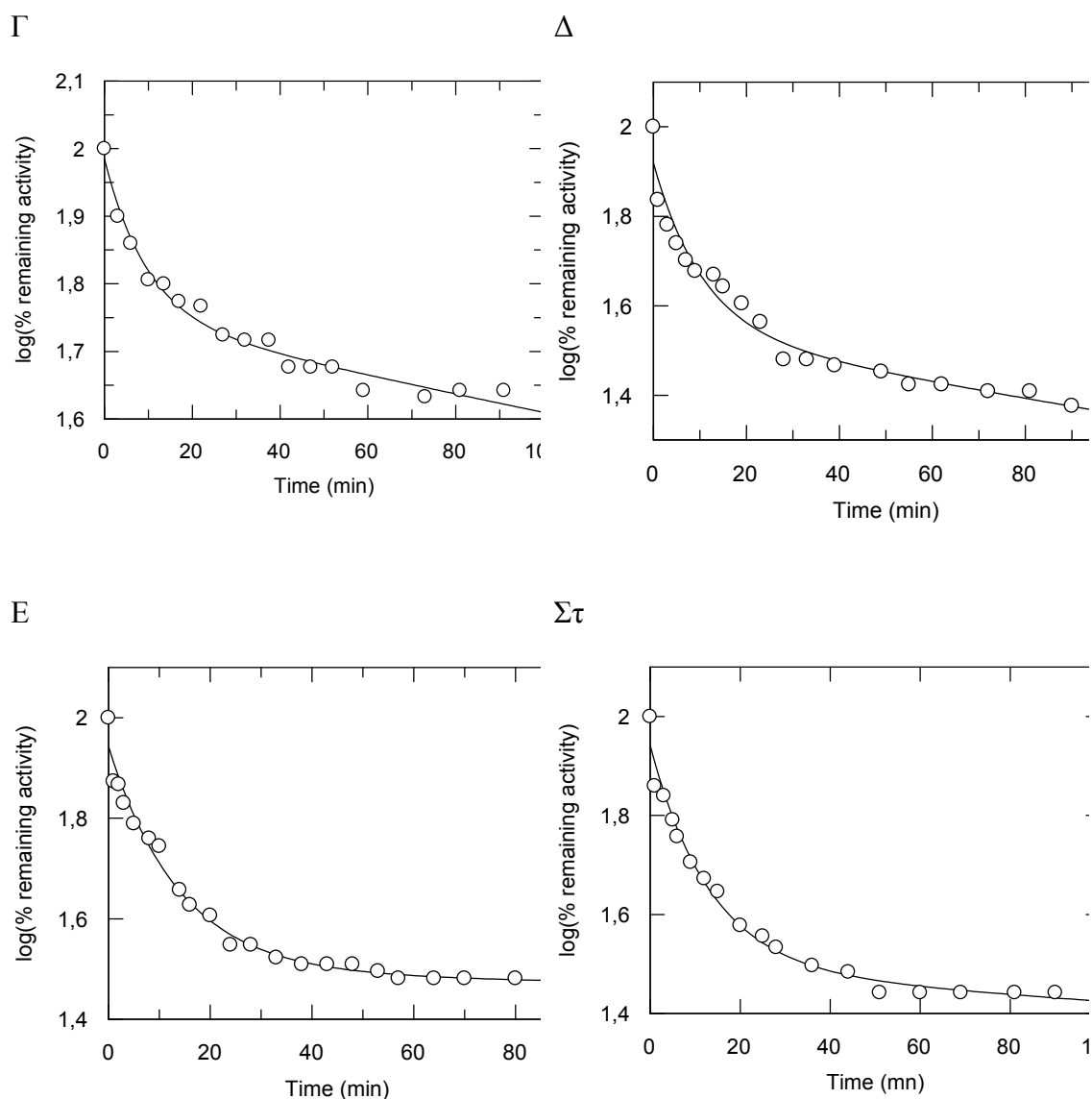
$$\log(\% \text{ παραμενουσα ενζ. δρασ.}) = (1 - F)e^{-k_{fast}t} + Fe^{-k_{slow}t} \quad (3)$$

Η γραφική παράσταση του  $k_{obs}$  έναντι του  $[D]$  σύμφωνα με τη σχέση (2) δίνει ορθογώνια υπερβολή από την οποία υπολογίζονται οι  $k_3$  και  $K_D$ .

Κατά την επώαση του ενζύμου παρουσία χρωστικής VBAR παρατηρήθηκε αδρανοποίηση του (Σχήμα 4.4). Παρατηρήθηκε ότι η πορεία αδρανοποίησης παρουσιάζει δύο φάσεις: α) μία αρχική ταχύτατη φάση αδρανοποίησης (fast phase) και ακολούθως μία αργή (slow phase). Όπως φαίνεται από το σχήμα, η πορεία αδρανοποίησης κάθε ενζύμου εμφανίζει τα χαρακτηριστικά χημικής αντίδρασης, αφού εξαρτάται από το χρόνο επώασης, και για κάποιο συγκεκριμένο χρόνο από τη συγκέντρωση της χρωστικής.

Από την κάθε καμπύλη και χρησιμοποιώντας τη σχέση (3), υπολογίζεται η ταχύτητα αδρανοποίησης για τις δύο φάσεις αδρανοποίησης (fast και slow) και για κάθε διαφορετική συγκέντρωση χρωστικής.





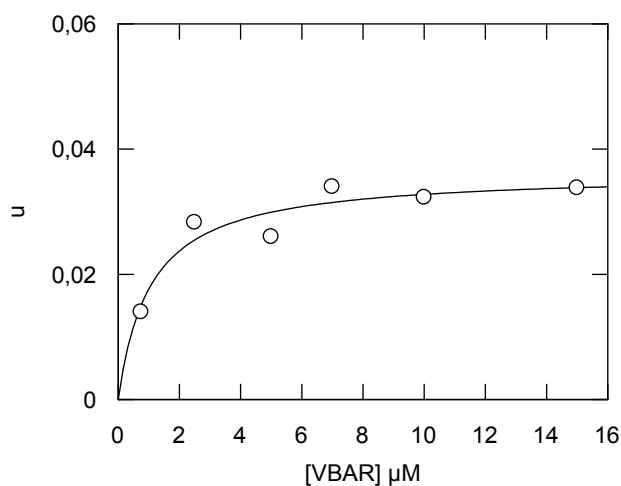
**Σχήμα 4.4.** Επίδραση της VBAR στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου σε συγκεντρώσεις 0,75 μM (Α), 2,5 μM (Β), 5 μM (Γ), 7 μM (Δ), 10 μM (Ε), 15 μM (Στ).

Στο Σχήμα 4.5 φαίνεται η γραφική παράσταση της ταχύτητας αδρανοποίησης για τις δύο φάσεις έναντι της συγκέντρωσης της χρωστικής, σύμφωνα με τη σχέση (2). Η εξάρτηση είναι υπερβολική έναντι της συγκέντρωσης της χρωστικής. Αυτό το κινητικό πρότυπο, συμφωνεί με εκείνο των Michaelis-Menten και ερμηνεύει την ύπαρξη, σε πρώτη φάση, ενός ενδιάμεσου αντιστρεπτού συμπλόκου ενζύμου-χρωστικής E:I (το οποίο είναι και το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας της

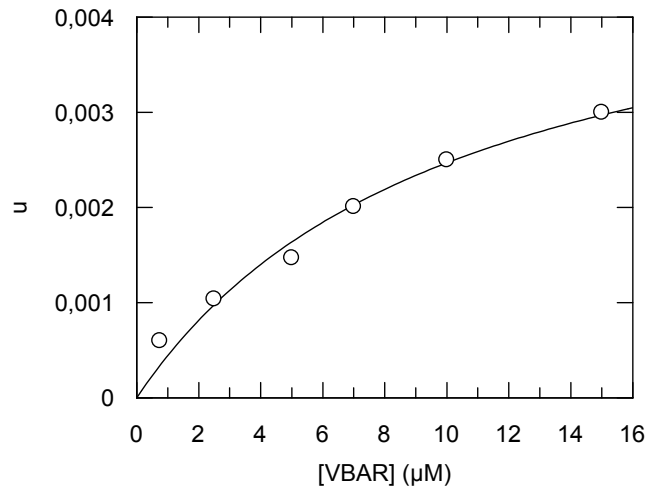
αντίδρασης) και, σε δεύτερη φάση, το σχηματισμό του ομοιοπολικού μη-αντιστρεπτού συμπλόκου E-I. Από το Σχήμα 4.5 και σύμφωνα με τη σχέση (2) υπολογίζεται η μέγιστη ταχύτητα αδρανοποίησης ( $k_3$ ) και η σταθερά διάστασης ( $K_D$ ) για τις δύο φάσεις αδρανοποίησης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Κινητικές παράμετροι	Ταχύτερη φάση αδρανοποίησης	Αργή φάση Αδρανοποίησης
$k_3$	$0,036 \text{ min}^{-1}$	$0,005 \text{ min}^{-1}$
$K_D$	$1,05 \text{ }\mu\text{M}$	$10,29 \text{ }\mu\text{M}$

A

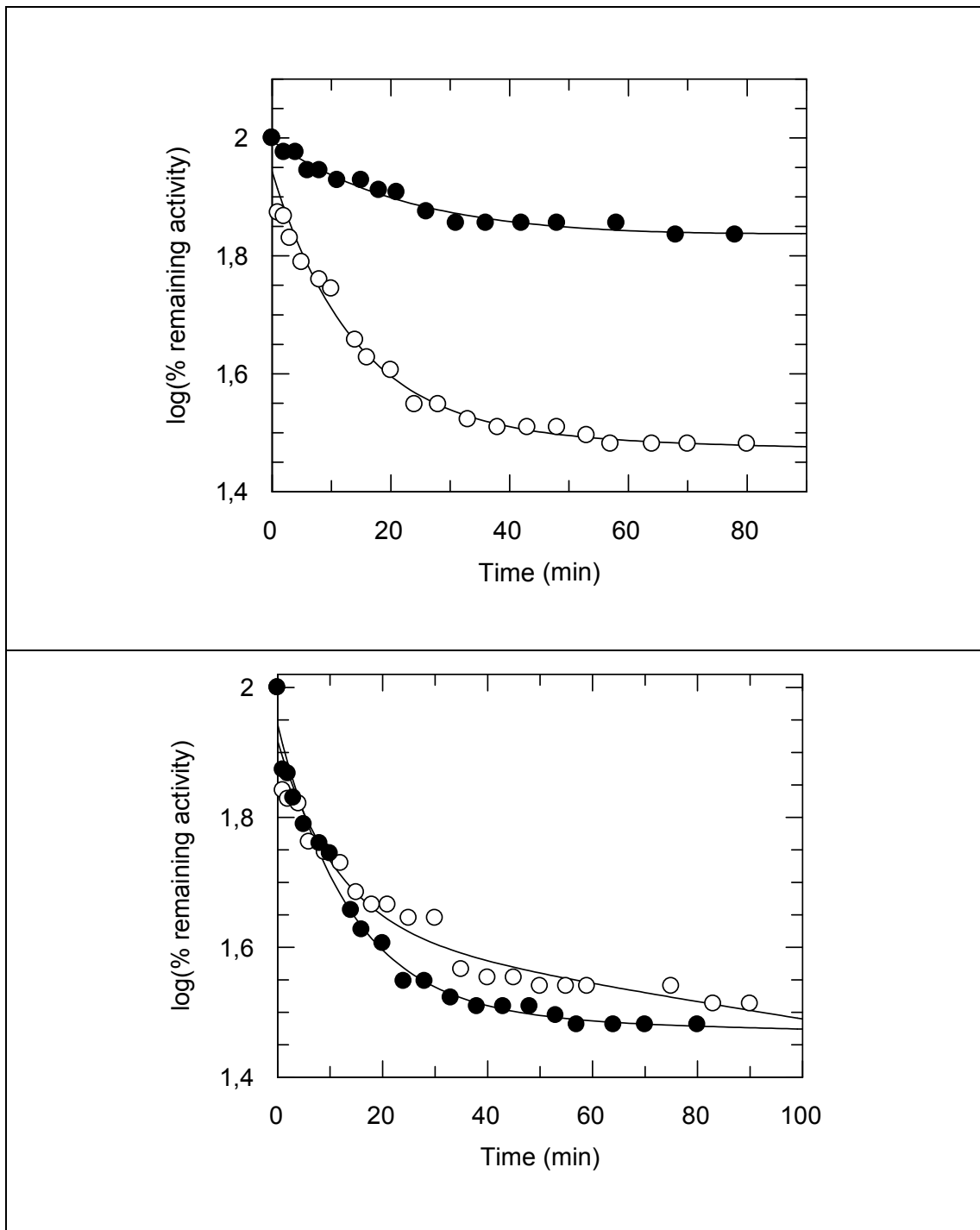


B



**Σχήμα 4.5.** Επίδραση της συγκέντρωσης της χρωστικής (VBAR) στην παρατηρούμενη ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου για την ταχύτατη (A) και αργή (B) φάση αδρανοποίησης.

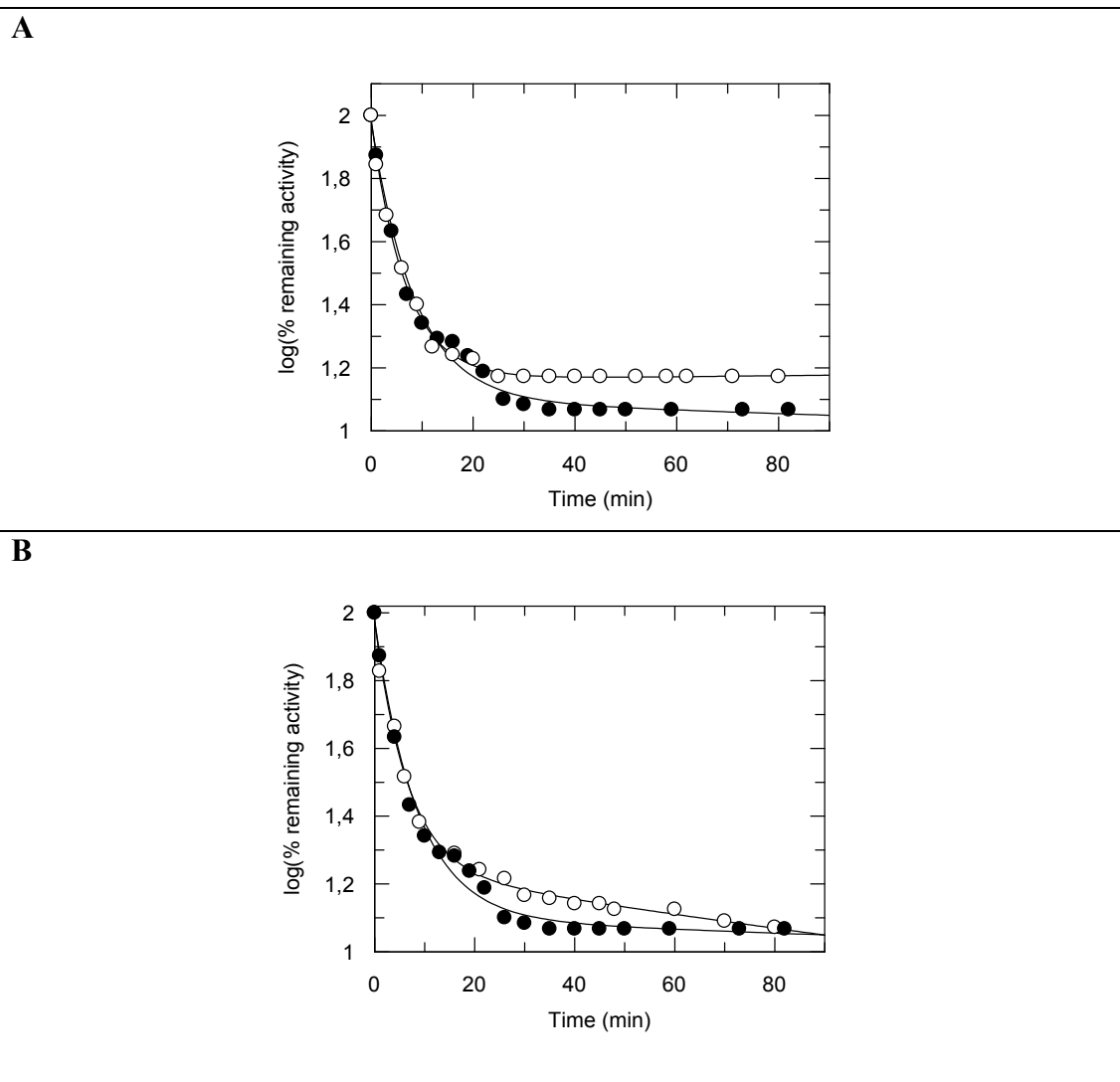
Η αδρανοποίηση των ενζύμων κατά την ομοιοπολική αντίδραση με την VBAR αποτελεί την πρώτη ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση είναι εκλεκτική. Η εκλεκτικότητα της αλληλεπίδρασης αποδείχτηκε με τη συναγωνιστική δράση του συναγωνιστικού αναστολέα (S-(4-νιτροβενζυλ-γλουταθείο) του ενζύμου έναντι της αδρανοποίησης του ενζύμου από τη χρωστική. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 4.6A και 4.6B, κατά την προσθήκη του αναστολέα S-(4-νιτροβενζυλ-γλουταθείο), η ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου από την VBAR μειώνεται που σημαίνει ότι υπάρχει άμεσος συναγωνισμός μεταξύ VBAR και αναστολέα για τη δέσμευση του στην ίδια θέση στο ένζυμο.



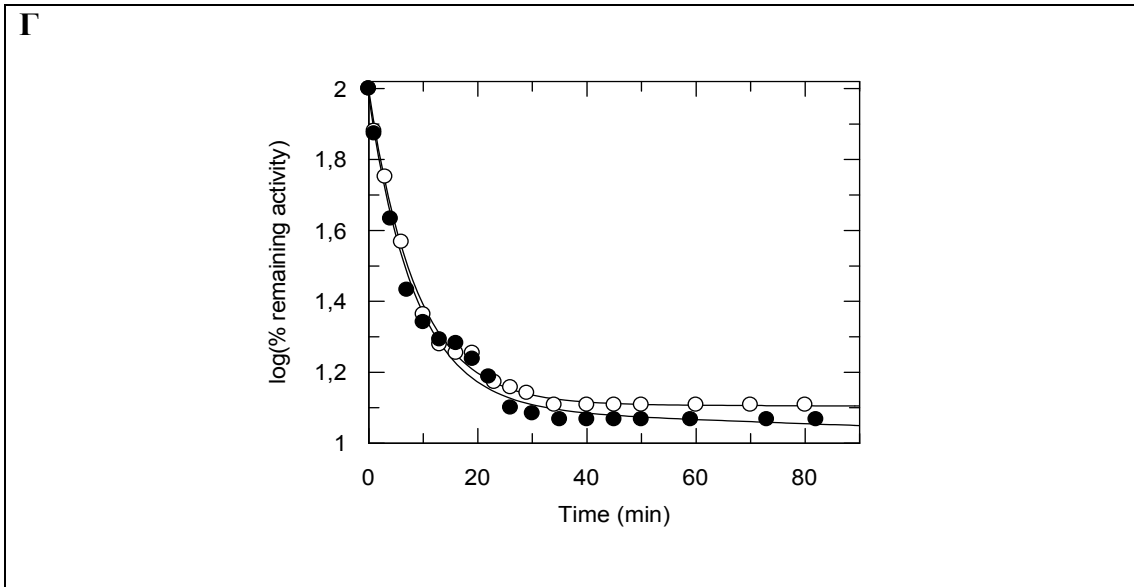
**Σχήμα 4.6** Επίδραση της VBAR 10 $\mu$ M (○, A και ●, B) στην ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου από τον αναστολέα S-(4-νιτροβενζυλ-)γλουταθείο (1mM, ●, A και 0,1 mM, ○, B).

Η παραπάνω συναγωνιστική δράση του αναστολέα έναντι της VBAR αποτελεί άμεση απόδειξη ότι η αλληλεπίδραση δε γίνεται κατά τρόπο τυχαίο αλλά εκλεκτικά, και μάλιστα στην περιοχή εκείνη του ενζύμου που αλληλεπιδρά με φυσικά του υποστρώματα.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση των ξενοβιοτικών DDT, endosulphan, dieldrin στην απενεργοποίηση του ενζύμου από την VBAR. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 4.7. Όπως φαίνεται από το Σχήμα τα DDT, endosulphan, dieldrin προστατεύουν το ένζυμο σε μικρό ποσοστό. Πιθανότατα αυτό να δείχνει ότι υπάρχει συναγωνισμός μεταξύ των ξενοβιοτικών και VBAR. Από το συγκεκριμένο όμως πείραμα χρησιμοποιώντας χαμηλές συγκεντρώσεις DDT, endosulphan, dieldrin (0,1 mM) και λαμβάνοντας υπόψη την περιορισμένη διαλυτότητα τους σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα είναι ενδεχομένως δύσκολο να αποσαφηνιστεί η συμπεριφορά των ξενοβιοτικών.







**Σχήμα 4.7** Επίδραση των endosulphan 0,1mM (A, ○), DDT 0,1mM (B, ○) και dieldrin 0,1mM (Γ, ○) στην ταχύτητα αδρανοποίησης του ενζύμου από τη VBAR (●).

**4.5. Επίδραση των ξενοβιοτικών ενώσεων DDT, dieldrin, endosulphan, CB3GA, ορθο/παρα/μετα-σουλφονυλ παραγώγων, VBAR και βρωμαμινικό οξύ επί της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου SjGST.**

Μελετήθηκε η επίδραση, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, των ξενοβιοτικών DDT (0-0,15mM), dieldrin (0-0,15mM) και endosulphan (0-0,15mM) στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου SjGST. Τα αποτελέσματα δίνονται στα ακόλουθα διαγράμματα (Σχήμα 4.8). Η τιμή  $IC_{50}$  είναι η τιμή της συγκέντρωσης του ξενοβιοτικού, ώστε η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου SjGST να είναι στο ήμισι της ενζυμικής δραστηριότητας που παρουσιάζει το ένζυμο χωρίς την επίδραση του ξενοβιοτικού (Παράγραφος 3.13). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα:

<b>Ξενοβιοτικά</b>	<b><math>IC_{50}</math></b>
dieldrin	1,372 ± 0,058 mM
DDT	0,130 ± 0,067mM
endosulphan	0,079 ± 0,005mM

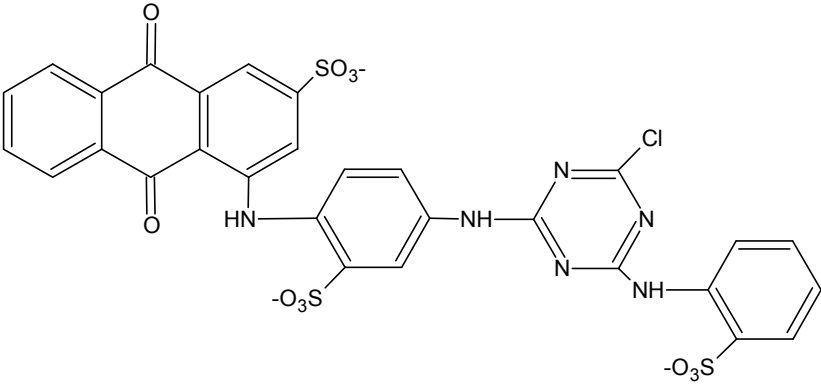
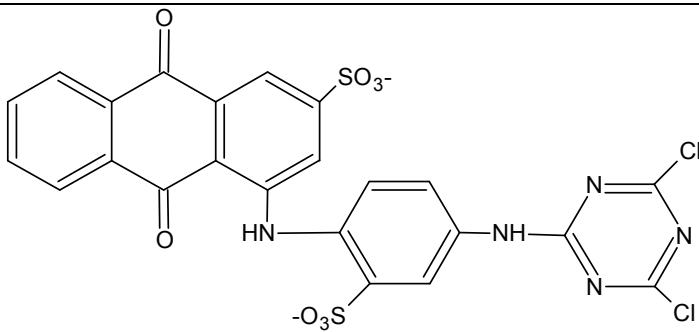
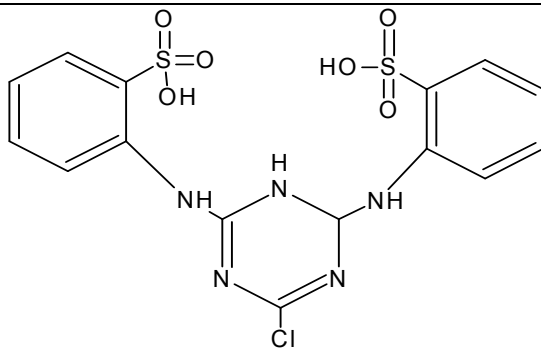
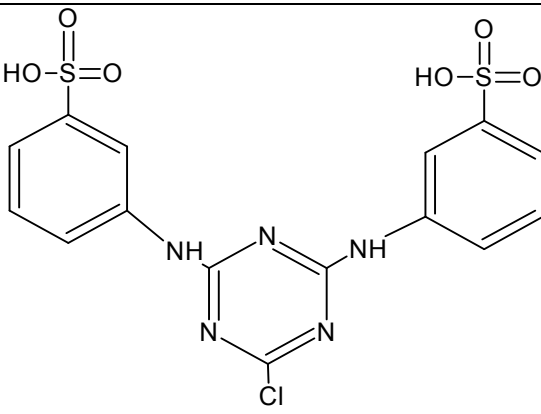
---

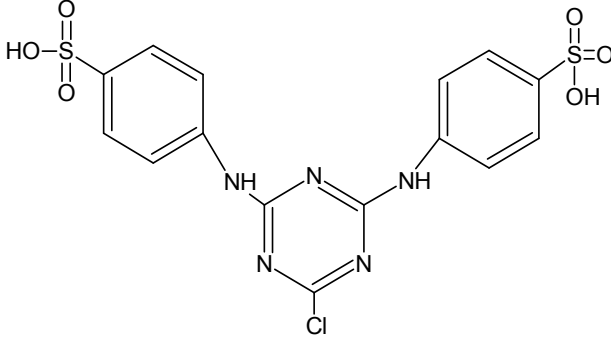
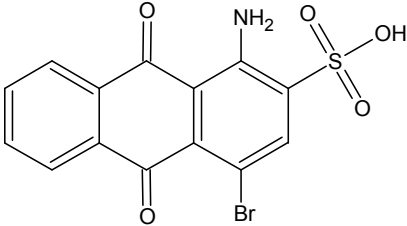
Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, της Cibacron blue 3GA (0-5 $\mu$ M), καθώς και δομικών θραυσμάτων της ορθο/ παρα/ μετα-σουλφονυλ παραγώγων (0-200 $\mu$ M), VBAR (0-6 $\mu$ M) και βρωμαμινικό οξύ (0-40 $\mu$ M) (Πίνακας 4.10), στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου *SjGST*. Τα αποτελέσματα δίνονται στα ακόλουθα διαγράμματα (Σχήμα 4.9). Η τιμή  $IC_{50}$  είναι η τιμή της συγκέντρωσης του ξενοβιοτικού, ώστε η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου *SjGST* να είναι στο ήμισι της ενζυμικής δραστηριότητας που είχε το ένζυμό μας χωρίς την επίδραση του ξενοβιοτικού (Παράγραφος 3.13). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα:

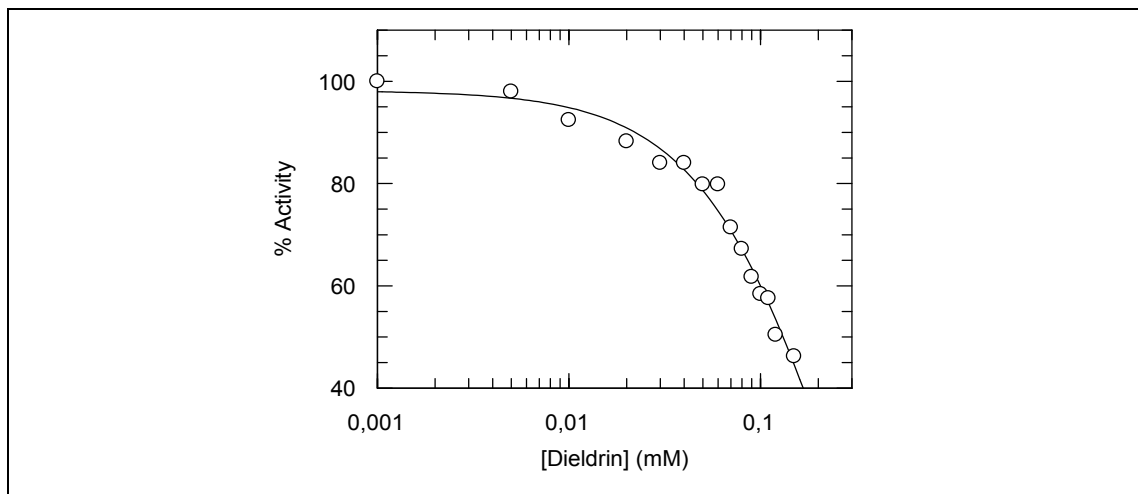
<b>Ξενοβιοτικά</b>	<b><math>IC_{50}</math></b>
CB3GA	0,057 $\pm$ 0,003 $\mu$ M
VBAR	0,196 $\pm$ 0,024 $\mu$ M
Βρωμαμινικό οξύ	5,250 $\pm$ 1,659 $\mu$ M
οABS-Trz-οABS,	73,161 $\pm$ 6,356 $\mu$ M
mABS-Trz-mABS	82,247 $\pm$ 13,994 $\mu$ M
pABS-Trz-pABS	36,481 $\pm$ 7,001 $\mu$ M

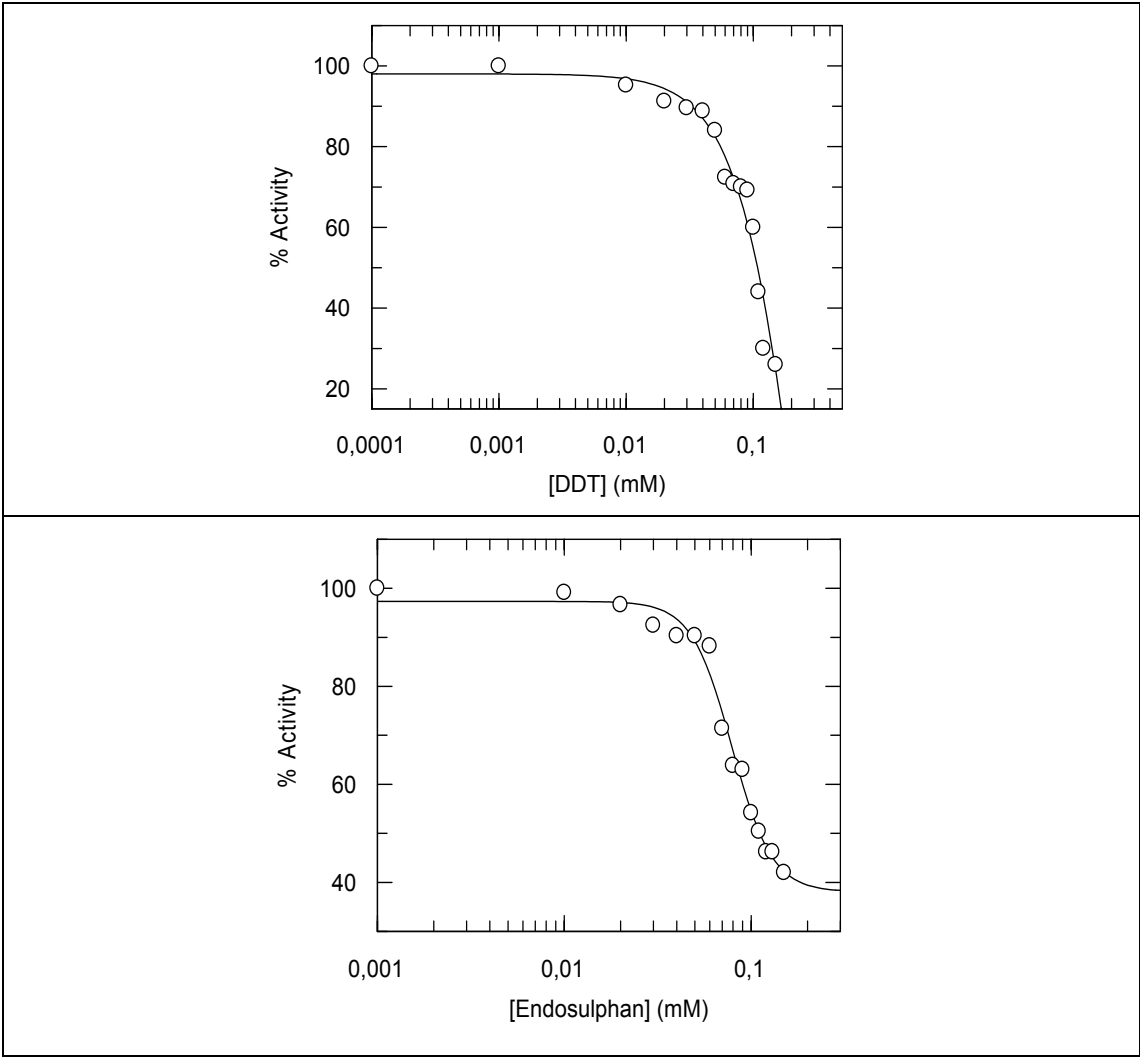
**Πίνακας 4.10.** Η δομή της CB3GA και των θραυσμάτων της ορθο/ παρα/ μετα-σουλφονυλ παραγώγων, VBAR και βρωμαμινικό οξύ.

---

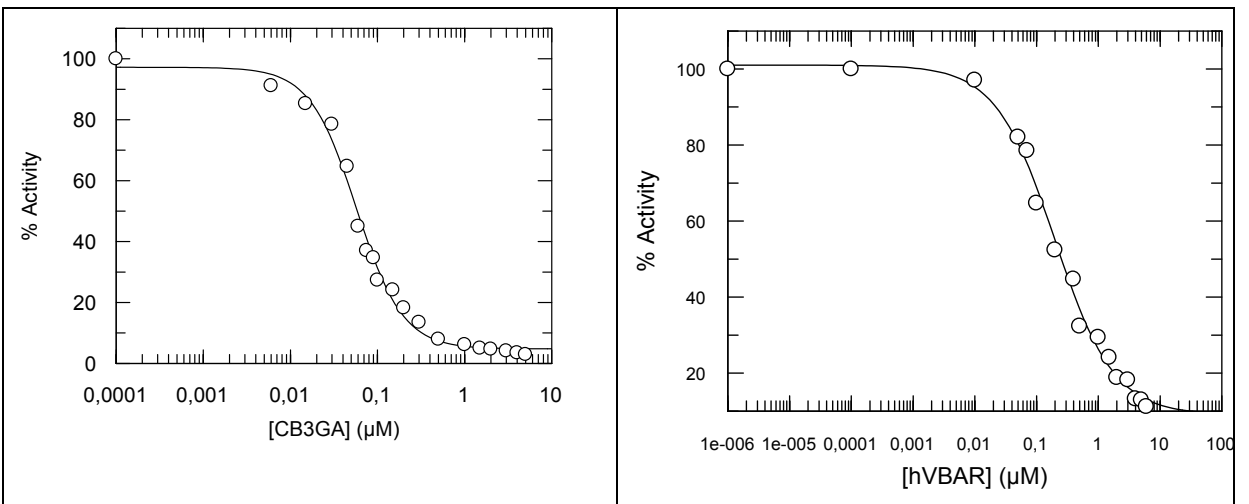
<u>Ξενοβιοτική ένωση</u>	<u>Συντακτικός τύπος</u>
<b><u>Cibacron blue 3GA</u></b>	
<b><u>VBAR</u></b>	
<b><u>Ορθο-σουλφονυλ-παράγωγο (2-({4-chloro-6-[(2-sulfophenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzenesulfonic acid)</u></b> <b>(oABS-Trz-oABS)</b>	
<b><u>Μετα-σουλφονυλ-παράγωγο(2-({4-chloro-6-[(3-sulfophenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzenesulfonic acid)</u></b> <b>(mABS-Trz-mABS)</b>	

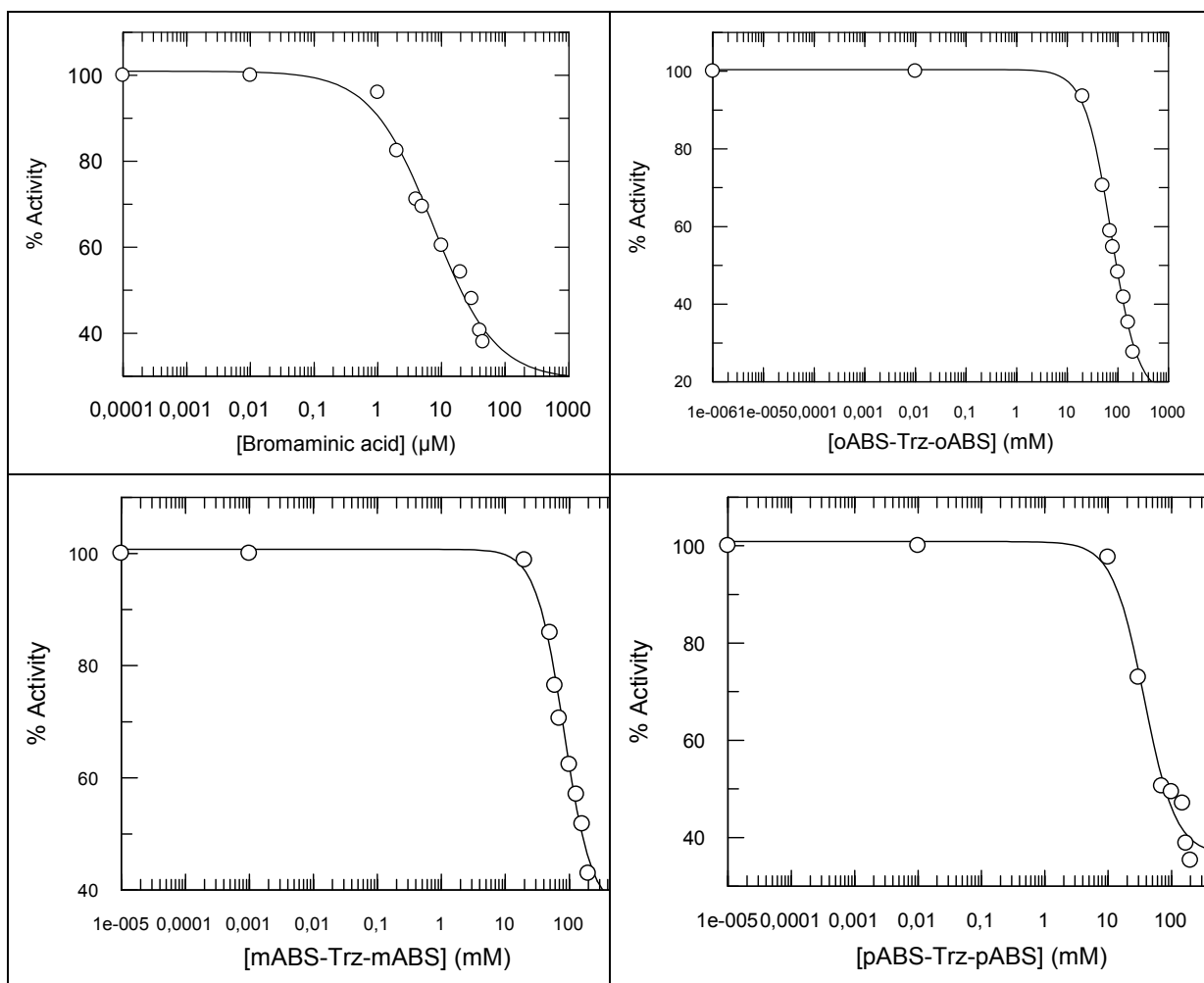
<p><b><u>Παρα-σουλφονυλ-παράγωγο(2-(4-chloro-6-[4-sulfophenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzenesulfonic acid)</u></b></p> <p><b>(pABS-Trz-pABS)</b></p>	
<p><b><u>Βρωμαμινικό οξύ</u></b></p>	





**Σχήμα 4.8.** Επίδραση των: (Α) dieldrin, (Β) DDT, (Γ) endosulphan, στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου SjGST.



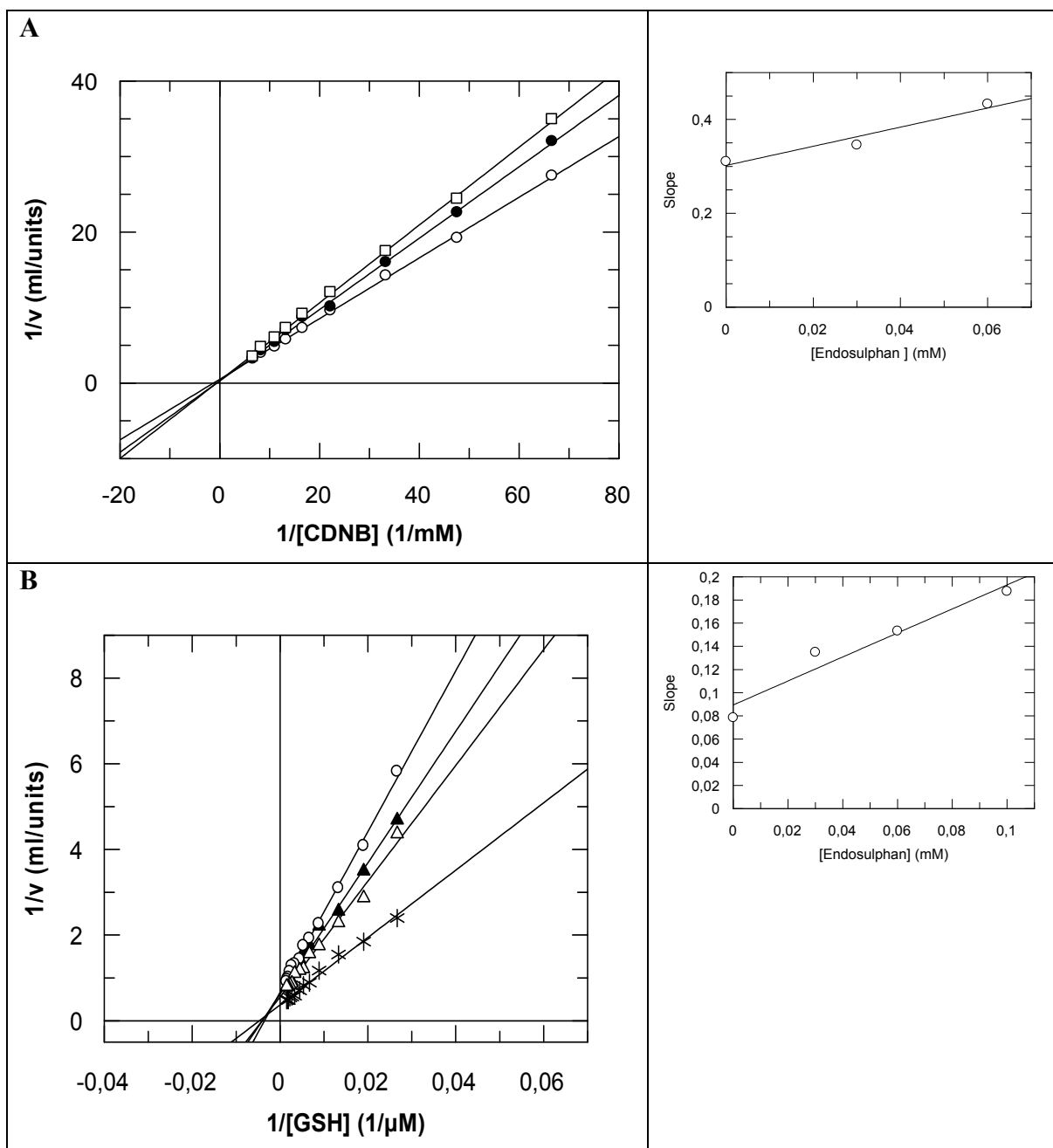


**Σχήμα 4.8.** Επίδραση των ξενοβιοτικών:(α) CB3GA, (β) VBAR, (γ) βρωμαμινικό οξύ, (δ) oABS-Trz-oABS, (ε) mABS-Trz-mABS και (στ) pABS-Trz-pABS, στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου *SjGST*.

#### 4.6. Κινητική ανάλυση του ενζύμου *SjGST* με υπό της επίδρασης των ξενοβιοτικών endosulphan και CB3GA.

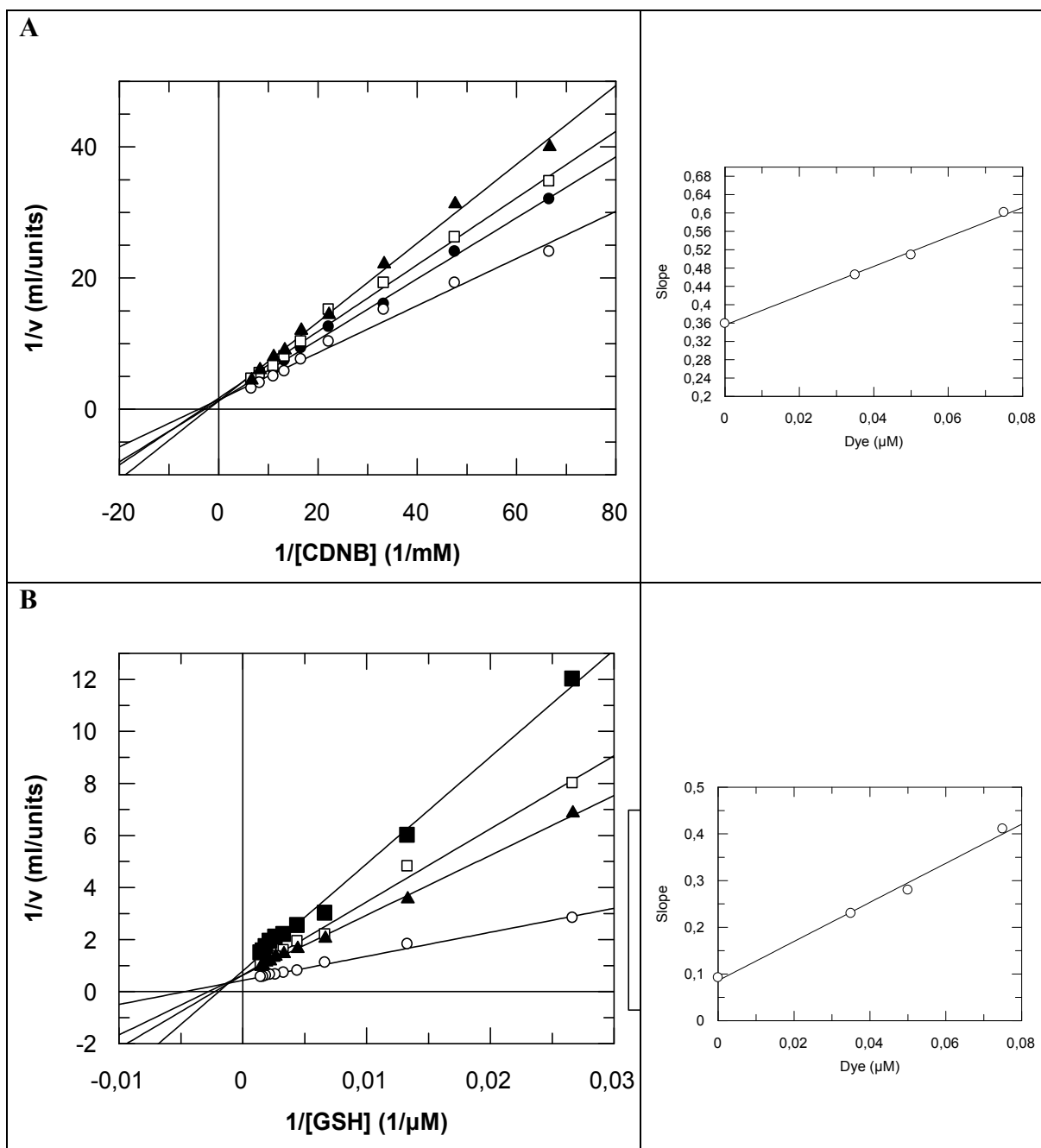
Ενζυμική κινητική είναι ο κλάδος εκείνος που μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Από τη μελέτη της κινητικής μιας ενζυμικής αντίδρασης λαμβάνονται σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό της αντίδρασης, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση της επίδρασης των ξενοβιοτικών CB3GA και Endosulphan χρησιμοποιώντας σαν μεταβαλλόμενα υποστρώματα το CDNB και GSH (Σχήμα 4.10 και Σχήμα 4.11).

Σκοπός της κινητικής ανάλυσης ήταν να διαπιστωθεί εάν το σημείο πρόσδεσης, επί του ενζύμου *Sj*GST, του κάθε ξενοβιοτικού συμπίπτει με τα σημεία πρόσδεσης των CDNB ή GSH. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της κινητικής ανάλυσης.



**Σχήμα 4.10.** Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk για την κινητική ανάλυση της αναστολής της καταλυτικής αντίδρασης του ενζύμου *Sj*GST. **(A)** Αναστολή του *Sj*GST από το endosulphan [0mM(○), 0,03mM(●) και 0,06(□)] σε σταθερή συγκέντρωση GSH και μεταβαλλόμενη CDNB (0,015-0,15mM), **(B)** Αναστολή του *Sj*GST από το endosulphan [0

mM(\*), 0,03mM ( $\Delta$ ), 0,06 mM ( $\blacktriangle$ ) και 0,1 mM ( $\circ$ )] σε σταθερή συγκέντρωση CDNB και μεταβαλλόμενη GSH (37,5-675 $\mu$ M). Δίπλα φαίνεται η γραφική παράσταση της κλίσης κάθε ευθείας Lineweaver-Burk έναντι της συγκέντρωσης του endosulphan.



**Σχήμα 4.14.** Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk για την κινητική ανάλυση της αναστολής της καταλυτικής αντίδρασης του ενζύμου *SjGST*. (A) Αναστολή του *SjGST* από CB3GA [0  $\mu$ M ( $\circ$ ), 0,035  $\mu$ M ( $\bullet$ ), 0,05  $\mu$ M ( $\square$ ) και 0,075  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ )] σε σταθερή συγκέντρωση GSH και μεταβαλλόμενη CDNB (0,015-0,15mM), (B) Αναστολή του *SjGST* από από CB3GA [0  $\mu$ M ( $\circ$ ), 0,035  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), 0,05  $\mu$ M ( $\square$ ) και 0,075  $\mu$ M ( $\blacksquare$ )] σε σταθερή συγκέντρωση CDNB και



---

μεταβαλλόμενη GSH (37,5-675 $\mu$ M). Δίπλα φαίνεται η γραφική παράσταση της κλίσης κάθε ευθείας Lineweaver-Burk έναντι της συγκέντρωσης της CB3GA.

Τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης και το είδος της αναστολής που παρατηρήθηκε με κάθε αναστολέα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα:

<b>Μεταβαλλόμενο υπόστρωμα</b>	<b>Endosulphan (Είδος αναστολής, <math>K_i</math>)</b>	<b>CB3GA (Είδος αναστολής, <math>K_i</math>)</b>
CDNB	Συναγωνιστική $K_i = 0,24$ mM	Συναγωνιστική $K_i = 0,11$ $\mu$ M
GSH	Μικτή $K_i = 11,6$ mM	Μικτή $K_i = 0,021$ $\mu$ M

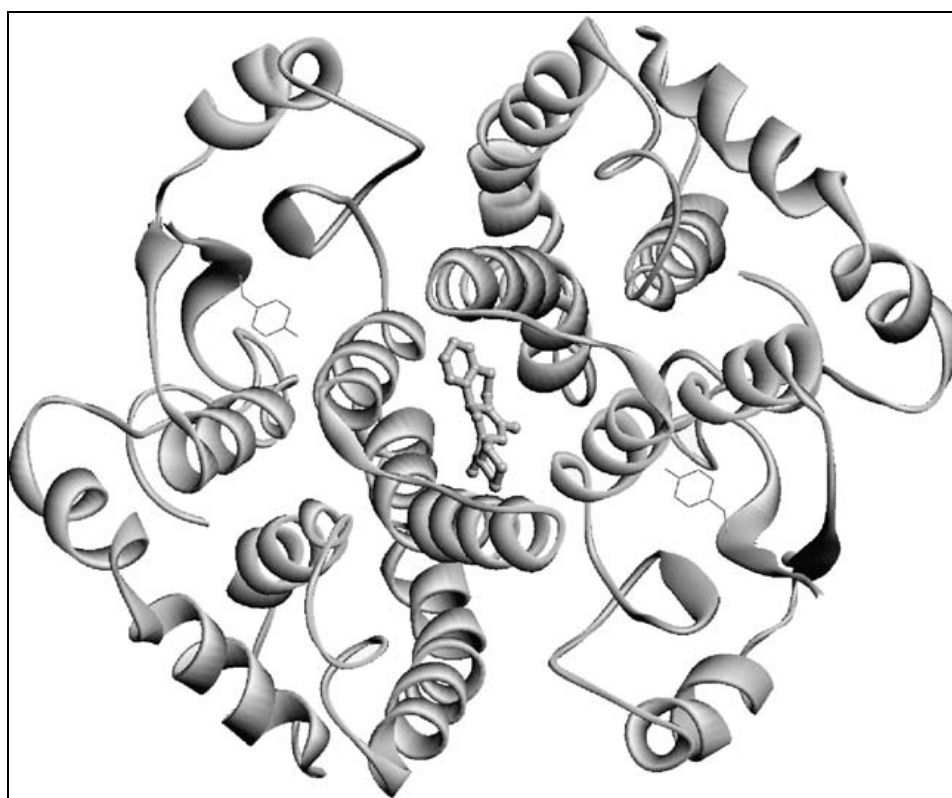
---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

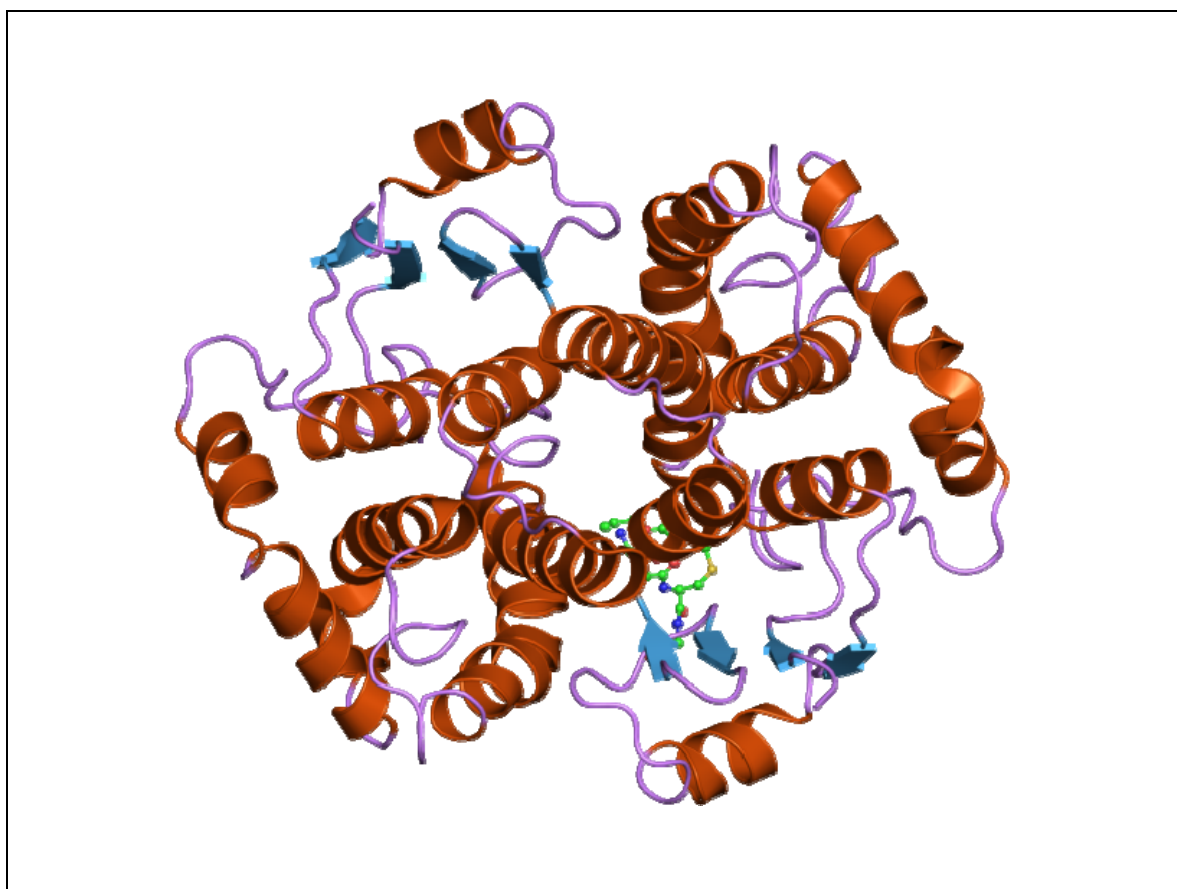
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι S-μεταφοράσες του γλουταθειού (GSTs) είναι ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην αδρανοποίηση του κυττάρου από εξωγενείς αλλά και ενδογενείς τοξικές για το κύτταρο ενώσεων. Η αδρανοποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της συμπλοκοποίησης αυτών των ενώσεων με το GSH. Το ενεργό κέντρο των GSTs αποτελείται από την περιοχή δέσμευσης του ξενοβιοτικού (G-θέση) και την περιοχή δέσμευσης της GSH (H-θέση).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε το ένζυμο GST από *Schistosoma japonica* (SjGST) (Σχήμα 5.1) το οποίο όπως αναλύθηκε στη παράγραφο 1.6 έχει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο ως ένζυμο αποτοξίνωσης και αποτελεί στόχο για τη δημιουργία εμβολίων και φαρμάκων έναντι της σχιστοσωμίας (Jao *et al.*, 2006). Επίσης το ένζυμο αυτό έχει πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές καθόσον χρησιμοποιείται στα συστήματα συντηγμένων πρωτεϊνών (fusion proteins) (Namiki *et al.*, 2003).



**Σχήμα 5.1.** Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του διμερούς του SjGST. Το φάρμακο PZQ που βρίσκεται προσδεμένο στην L-θέση δέσμευσης παρουσιάζεται με σφαίρες και ράβδους. Το καταλυτικό κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr6) που βρίσκεται στη G-θέση δέσμευσης παρουσιάζεται με γραμμές. Ο αριθμός καταχώρησης του ενζύμου PDB είναι 1GTB (Yassin *et al.*, 2004).



**Σχήμα 5.2.** Παρουσίαση της τρισδιάστατης δομής του διμερούς του *SjGST*. Ο αναστολέας οκτυλ-GSH που βρίσκεται προσδεμένο και επικαλύπτει την G- και H-θέση παρουσιάζεται με σφαίρες και ράβδους (PDBe Entry: 1u88).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου σε ένα στάδιο μέσω χρωματογραφίας συγγένειας σε προσροφητή που φέρει GSH ακινητοποιημένο σε αγαρόζη (S-εξυλ-GSH). Το αποτέλεσμα του καθαρισμού με τη συγκεκριμένη στήλη κρίθηκε ικανοποιητικό, εφόσον έδωσε 11,02-φορές καθαρισμό με απόδοση 77,55 % (Πίνακας 4.1).

Από τα αποτελέσματα της αναστολής του ενζύμου GST με ξενοβιοτικές ενώσεις, οι οποίες είναι φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και τριαζινο-χρωστικές, διαπιστώθηκε ότι κατά γενικό κανόνα οι χρωστικές παρουσίασαν αυξημένη ικανότητα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (Πίνακας 4.2). Επίσης, εκ των υπολοίπων ξενοβιοτικών ενώσεων τη σημαντικότερη μείωση της ενζυμικής

---

δραστικότητας του ενζύμου *SjGST*, παρουσίασαν τα εντομοκτόνα endosulphan, DDT και dieldrin (Σχήμα 4.3). Με βάση τα ανωτέρω επιλέχθηκαν οι ουσίες endosulphan, DDT, dieldrin και η χρωστική CB3GA για περαιτέρω μελέτη.

Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι τιμές  $IC_{50}$  των endosulphan, DDT, dieldrin, CB3GA και των θραυσμάτων της ορθο/παρα/μετα-σουλφονυλ παραγώγων, το βρωμαμινικό οξύ και VBAR (Πίνακα 4.10). Από τα διαγράμματα που προέκυψαν, διαπιστώθηκε ότι το endosulphan παρουσιάζει μικρότερη τιμή  $IC_{50}$ , σε σχέση με τα DDT και dieldrin (Σχήμα 4.7). Όσον αφορά την CB3GA και τα θραύσματά της, διαπιστώθηκε ότι όσο μειωνόταν το μέγεθος της ξενοβιοτικής ουσίας, τόσο αυξανόταν η  $IC_{50}$  (Σχήμα 4.8).

Για την ξενοβιοτική ουσία endosulphan παρατηρήθηκε συναγωνιστική αναστολή με το CDNB και μη συναγωνιστική αναστολή με τη GSH (Σχήμα 4.13). Για την ξενοβιοτική ουσία CB3GA βρέθηκε συναγωνιστική αναστολή με το CDNB και μικτή αναστολή με τη GSH (Σχήμα 4.14). Τα παραπάνω συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι οι ξενοβιοτικές ενώσεις που μελετήθηκαν αλληλεπιδρούν με την Η-περιοχή του ενζύμου ενώ πιθανότατα επικαλύπτουν και μέρος της G-περιοχής (Σχήμα 5.2).

Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω. Οι δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να αποτελέσουν 'οδηγούς' για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων του ενζύμου με πιθανή φαρμακευτική δράση.

---

**Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pinkus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R., Ronai Z.** (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* **18**, 1321–1334.

**Alfenito M.R., Souer E., Goodman C.D., Buell R., Mol J., Koes R. and Walbot V.** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell.* **10**, 1135-1149.

**Alias Z., Clark A.G.** (2007) Studies on the glutathione S-transferase proteome of adult *Drosophila melanogaster*: responsiveness to chemical challenge. *Proteomics.* **7**, 3618-3628.

**Allocati N., Casalone E., Masulli M., Ceccarelli I., Carletti E., Parker M.W. and Di Ilio C.** (1999) Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1. *FEBS Lett.* **445**, 347-350.

[Allocati N.](#), [Favaloro B.](#), [Masulli M.](#), [Alexeyev M.F.](#), [Di Ilio C.](#) (2003) *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem. J.* **373**, 305-311.

**Ames B.N., Profet M., Gold L.S.** (1990) Nature's chemicals and synthetic chemicals: Comparative toxicology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7782-7786.

**Amicarelli F., Falone S., Cattani F., Alamanou M.T., Bonfigli A., et al.** (2004) Amphibian transition to the oxidant terrestrial environment affects the expression of glutathione S-transferases isoenzymatic pattern. *Biochim. Biophys. Acta* **1691** (2–3), 181–192.

**An J.H., Blackwell T.K.** (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* **17**, 1882–1893.

**Andrews P., Thomas H., Pohlke R., Seubert J.** (1983) Praziquantel. *Med. Res. Rev.* **3**, 147–200.

---

**Arca P., Hardisson C., Suarez J.E.** (1990) Purification of glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 844-848.

**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.** (1991) Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure and function. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 131-140.

**Armstrong R.N.** (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* **10**, 2-18.

**Atkins W.M., Wang R.W., Bird A.W., Newton D.J., Lu A.Y.** (1993) The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. *J. Biol. Chem.* **268**, 19188-19191.

**Axarli I., Rigden D.J., Labrou N.E.** (2004) Characterization of the ligandin site of maize glutathione transferase I, *Biochemical J.* **382**, 885-893.

**Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvalho D., Lecocq J.P., Capron A.** (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature (London)*, **326**, 149-154.

**Bartling D., Radzio R., Steiner U., Weiler E.W.** (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem.* **216**, 579-586.

**Batist G., Tulpules A., Sinha B., Katki A., Myers C.E., Cowan K.H.** (1986) Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 15544-15549.

---

**Bilang J., Sturm A.** (1995) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* **109**, 253 -260.

**Blackburn A.C., Coggan M., Tzeng H-F., Lantum H., Polekhina G., Parker M.W., Anders M.W., Board P.G.** (2001) GSTZ1d, a new allele of glutathione transferase Zeta and maleylacetoacetate isomerase. *Pharmacogenetics.* **11**, 671-678.

**Blackburn A.C., Tzeng H.F., Anders M.W., Board P.G.** (2000) Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics.* **10**, 49-57.

**Board P.G., Baker R.T., Chelvanayagam G., Jermin L.S.** (1997) Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* **328**, 929-935.

**Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermin L.S., Schulte G.K., Danley D.E., Hoth L. R., Griñor M.C., Kamath A. V. et al.** (2000) Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **275**, 24798-24806.

**Boyland E., Chasseaud L.F.** (1967). Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem. J.* **104**, 95-102.

**Brophy P. M., Barrett J.** (1990) Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* **100**, 345-349.

**Bushweller J.H., Billeter M., Holmgren A., Wuetrich K.** (1994) The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin (C14S) and glutathione. *J. Mol. Biol.* **235**, 1585-1597.



---

**Cardoso R.M.F., Daniels D.S., Bruns C.M., Tainer J.A.** (2003) Characterization of the electrophile binding site and substrate binding mode of the 26-kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **51**, 137 – 146.

**Chelvanayagam, G., Parker, M.W., Board, P.G.** (2001) Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.* **133**, 256–260.

**Chittenden T., Livingston D.M., Kaelin W.G.** (1991) The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* **65**, 1073-1082.

**Cho S.G., Lee Y.H., Park H.S., Ryoo K., Kank K.W., Park J., Eom S.J., Kim M.J., Chang T.S., Choi S.Y., Shim J., Kim Y., Dong M.J., Kim S.G., Ichijo H., Choi F.J.** (2001) Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 12749–12755.

**Clark J.D., Lin L.-L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L.** (1991) A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA2 contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*. **65**, 1043-1051.

**Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.A.A., Davies T.G.E.** (1997) Detoxification of Xenobiotics by plants: chemical modifications and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*. **2**, 144-151.

**Cummins I., Cole D.J., Edwards R.** (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* **18**, 285-292.

**Clark J.D., Lin L.-L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N. and Knopf J.L.** (1991) A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA2

---

contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*. **65**, 1043-1051.

**Davern K.M., Tiu W.U., Samaras N., Gearing D.P., Hall B.E., Garcia, E.G., Mitchell G.F.** (1990) *Schistosoma japonicum*: Monoclonal antibodies to the Mr 26,000 schistosome glutathione-S-transferase (sj26) in an assay for circulating antigen in infected individuals. *Exp. Parasitol.* **70**, 293–304.

**Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J.** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**, 159–172.

**Diesperger H., Sandermann H.** (1979) Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta*. **146**, 643-648.

**Dirr H., Reinemer P., Huber R.** (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., Cummins I., Cole D.J., Edwards R.** (1998) Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1**, 258–266.

**Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R.** (2002a). Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* **3**, 3004.1–3004.10.

**Dixon D.P., Davies B.G., Edwards R.** (2002b) 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.

**Droog F.** (1997) Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.* **16**, 95–107.

---

**Edwards R., Dixon, D.P.** (2000) The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (A. H. Cobb and R. C. Kirkwood, Eds.), 38–71. Sheffield Academic Press, Sheffield, England.

**Edwards R., Dixon D.P.** (2004) Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione *S* transferase superfamily. In *Molecular Ecotoxicology of Plants*, ed. H Sandermann, Ecological Studies Vol. **170**, pp. 17–50. Heidelberg: Springer Verlag.

**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.

**Epp O., Ladenstein R., Wendel A.** (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **133**, 51-69.

**Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G.** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* **100**, 234-240.

**Evans J.F., Leville C., Mancini J.A., Prasit P., Therien M., et al.** (1991) 5-Lipoxygenaseactivating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **40**, 22–27.

**Fernandez-Canon J.M., Penalva M.A.** (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* **273**, 329-337.

**Fikrig E., Barthold S.W., Kantor F.S., Flavell R.A.** (1990) Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* **250**, 553-556.

**Findlay V.J., Townsend D.M., Saavedra J.E., Buzard G.S., Citro M.L., Keefer L.K., Ji X., Tew K.D.** (2004) Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1070-1079.

---

**Ford-Hutchinson A.W.** (1990) Leukotriene B4 in inflammation. *Critical Reviews in Immunology*. **10**(1), 1-12.

**Frova C.** (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, function, expression and evolution. *Physiologia Plantarum*. **119**, 469-479.

**Frova C.** (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* **23**, 149-169.

**Gonneau J., Mornet R., Laloue M.** (1998) A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol Plant*. **103**, 114-124.

**Grundy J.E., Storey K.B.** (1998) Antioxidant defences and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol. B* **168**, 132–142.

**Guengerich F. P.** (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 97-153.

**Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R.** (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51-88.

**Hayes J.D., 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., 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. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 445-600.

**Ishikawa T.** (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pumps. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 463-468.

---

**Jablonkai I. et al.** (1997) Chemical catalysis of the isomerization of a peroxidising herbicidal thiadiazolidine. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, pp. 771–776, *British Crop Protection Council, Farnham, UK*.

**Jakobsson P.J., Mancini J.A., Ford-Hutchinson A.W.** (1996) Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C<sub>4</sub> synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenaseactivating protein and leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *J. Biol. Chem.* **271**, 22203-22210.

**Jakobsson P.J., Thoren 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. USA* **96**, 7220–25.

**Jao S-C., Chen J., Yang K., Li W-S.** (2006) Design of protent inhibitors for *Schistosoma japonica* glutathione S-transferase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **14**, 304-318.

**Jensson H., Guthenberg C., Alin P., Mannervik B.** (1986) Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett.* **203**, 207–209.

**Ji X., Johnson W.W., Sesay M.A., Dickert L., Prasad S.M., Ammon H.L., Armstrong R.A., Gilliland G.L.** (1994) Structure and function of the xenobiotic substrate binding site of a glutathione S-transferase as revealed by x-ray crystallographic analysis of product complexes of 9-(S-glutathionyl)-10-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene. *Biochemistry*. **33**, 1043–1052.

**Ji X., von Rosenvinge E.C., Johnson W.W., Armstrong R.N., Gilliland G.L.** (1996) Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8208–8213.

---

**Ji X., Zhang P., Armstrong R.N., Gilliland, G.L.** (1992) The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the *Mu* gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution. *Biochemistry*. **31**, 10169-10184.

**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.

**Johansson A.S., Mannervik B.** (2002) Active-site residues governing high steroid isomerase activity in human glutathione transferase A3-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 16648-16654.

**Jowsey R.I., Thomson R.E., Orton T.C., Elcombe C.R., Hayes J.D.** (2003) Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem. J.* **373**, 559–569.

**Kanaoka Y., Ago H., Inagaki E., Nanayama T., Miyano M., Kikuno R., Fujii Y., Eguchi N., Toh H., Urade Y., Hayaishi O.** (1997) Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* **90**, 1085–1095.

**Katti S.K., LeMaster D.M., Eklund H.** (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 167-184.

**Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B.** (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **251**, 6183-6188.

**Kobayashi M., Itoh K., Suzuki T., Osanai H., Nishikawa K., et al.** (2002) Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* **7**, 807–820.

**Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E.** (1996) Old enzymes for a new job (herbicide detoxification in plants). *Plant Physiol.* **111**, 349–353.

---

**Labrou N.E., Mello L.V., Clonis Y.D.** (2001) Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem J.* **358**, 101-110.

**Ladner J.E., Parson J.F., Rife C.L., Gilliland G.L., Armstrong R.N.** (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanisms of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry.* **43**, 352–361.

**Laemmli** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.

**Leiers B, Kampkotter A, Grevelding CG, Link CD, Johnson TE, Henkle-Duhrsen K.** (2003) A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1405–1415.

**Le Trong I, Stenkamp R.E., Ibarra C., Atkins W.M., Adman E.T.** (2002) 1.3-Å resolution structure of human glutathione S-transferase with S-hexyl glutathione bound reveals possible extended ligandin binding site. *Proteins.* **48**, 618–627.

**Lim K., Ho J.X., Keeling K., Gilliland G.L., Ji X.H., Ruker F., Carter D.C.** (1994) Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralising epitope of GP41 from HIV. *Protein Sci.* **3**, 2233-2244.

**Lineweaver H., Burk D.** (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. of the American Chem. Soc.* **56**, 658-666.

**Listowsky I.** (1993) High capacity binding by glutathione S-transferases and glucocorticoid resistance. In: Tew, K.D., Pickett, C.B., Mantle, T.J., Mannervik, B., Hayes, J.D. (Eds.), *Structure and Function of Glutathione Transferases*. CRC Press, Boca Raton, FL, 199–209.

---

**Listowsky I., Abramovitz M., Homma H., Niitsu Y.** (1988) Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferase. *Drug Metab. Rev.* **19**, 305-318.

**Loyall L., Uchida K., Brown S., Furuya M., Frohnmeyer H.** (2000) Glutathione and a UV-light induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell.* **12**, 1939–1950.

**Lucey D.R., Maguir J.H.** (1993) Schistosomiasis. *Parasit. Dis.* **7**, 635–645.

**Mannervik, B.** (1985) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **113**, 490-495.

**Mannervik B., Danielson U.H., Ketterer C.** (1988). Glutathione transferases-Structure and catalytic activit. *Critical Rev. in Biochem. and Mol. Biol.* **23**, 283-337.

**Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R., Pickett C.B., Sato K., Widersten M., Wolf C.R.** (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* **282**, 305-306.

**Martin J.L., Bardwell J.C.A., Kuriyan J.** (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulfide bond formation in vivo. *Nature (London)* **365**, 464-468.

**Marrs K.A.** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **47**, 127–158.

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

**McElwee J.J., Schuster E., Blanc E., Piper M.D., Thomas J.H., Patel D.S., Selman C., Withers D.J., Thornton J.M., Partridge L., Gems D.** (2007) Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms *Genome Biology.* **8**, R:132.1-132.16.



---

**McTigue M.A., Williams D.R., Tainer J.A.** (1995) Crystal structure of a schistosomal drug and vaccine target : Glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* **246**, 21-27.

**Meyer D.J., Muimo R., Thomas M., Coates D., Isaac R.E.** (1995) Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem. J.* **313**, 223-227.

**Meyer D. J., Thomas M.** (1995) Characterization of a rat spleen prostaglandin-H D-isomerase as a Sigma class glutathione S-transferase. *Biochem. J.* **311**, 739-742.

**Moons A.** (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant Glutathione S-transferases(GSTs). *Vitamins and Hormones.* **72**, 155-202.

**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.

**Namiki S., Tomida T., Tanabe M., Iino M., Hirose K.** (2003) Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 592-597.

**Oakley A.J., Lo Bello M., Nuccetelli M., Mazzetti A.P., Parker M.W.** (1999) The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* **291**, 913-926.

**Piper P.J.** (1984) Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.* **64**, 744-761.

**Prohaska J.R., Ganther H.E.** (1976) Glutathione peroxidase activity of glutathione-s-transferases purified from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 437-445.

---

**Puchalski R.B., Fahl W.E.** (1990) Expression of recombinant glutathione S-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2443-2447.

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

**Reinemer P., Dirr H. W., Ladenstein R., Schaffer J., Galley O., Huber R.** (1991) The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.8 Å resolution. *EMBO J.* **10**, 1997-2005.

**Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Huber R., Lo Bello M., Federici G., Parker M.W.** (1992a) Three-dimensional structure of class Pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 214–226.

**Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Schaffer J., Galley O., Huber R.** (1992b) The three-dimensional structure of class pi glutathione-S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *Biochemistry.* **31**, 10169–10184.

**Reinemer P., Prade L., Hof P., Neuefeind T., Huber R., Zettl R., Palme K., Schell J., Koelin 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.

**Robinson A., Huttley G.A., Booth H.S., Board P.G.** (2004) Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa class glutathione transferase predict a novel third transferase family with homology to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* **379**, 541–552.

**Rossjohn J., Feil S.C., Wilce M.C.J., Sexton J.L., Spithill T.W., Parker M.W.** (1997) Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite

---

vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase. *J. Mol. Biol.* **273**, 857-872.

**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.

**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.* **6**, 721-734.

**Rufer A.C, Thiebach L., Baer K., Klein H.W., Hennig M.** (2005) X-ray structure of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum* in a new crystal form reveals flexibility of the substrate-binding site *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **61**, 263–265.

**Ruscoe J.E., Rosario L.A., Wang T., Gate L., Arifoglu P., et al.** (2001) Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GST $\pi$ ) influences cell proliferation pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 339–345.

**Rushmore T.H., Pickett C.B.** (1993) Glutathione S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* **268**, 11475-11478.

**Sayed Y., Hornby J.A., Lopez M., Dirr H.** (2002) Thermodynamics of the ligandin function of human class Alpha glutathione transferase A1-1: energetics of organic anion ligand binding. *Biochem. J.* **363**, 341–346.

**Sayed Y., Wallance L.A., Dirr H.W.** (2000) The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability. *FEBS Lett.* **465**, 169-172.

**Scalla R., Roulet A.** (2002) Cloning and characterisation of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant.* **116**, 336–344.

---

**Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchell G.F., Campbell N.J.** (1990) Glutathione *S*-transferase: Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* **145**, 3905–3910.

**[Sharp J.D.](#), [White D.L.](#), [Chiou X.G.](#), [Goodson T.](#), [Gamboa G.C.](#), [McClure D.](#), [Burgett S.](#), [Hoskins J.](#), [Skatrud P.L.](#), [Sportsman J.R.](#)** (1991) Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **266**(23), 14850-3.

**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.

**Shekhar K.C.** (1991) Schistosomiasis drug therapy and treatment considerations. *Drugs.* **3**, 379–405.

**Sher A., James S.L., Correa-Oliveira R., Henry S.** (1989) Schistosome vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology*, **98**, S61–S68.

**Shu-hua X., Ji-qing Y., Hui-fang G., Catto B.A.** (1991) Uptake and effect of praziquantel and the major human oxidative metabolite 4-hydroxypraziquantel by *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* **77**, 241–245.

**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 T A.** (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.

**Smith D.B., Davern K.M., Board P.G., Tui W.U., Garcia E.G., Mitchell G.F.** (1986) Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI

---

129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **83**, 8703–8707.

**Smith, D.B., Johnson, K.S.** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. **67**, 31-40.

**Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B.** (2003) Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* **36**, 433-442.

**Sun T.H., Morgenstern R.** (1997) Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochem. J.* **326**, 193-196.

**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.

**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**, 949-962.

**Tipping E., Ketterer B., Christodoulides L., Enderby G.** (1976) The non-covalent binding of small molecules by ligandin. Interactions with steroids and their conjugates, fatty acids, bromosulphophthalein carcinogens, glutathione and related compounds. *Eur. J. Biochem.* **67**, 583–590.

**Townsend D.M., Tew K.D.** (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* **22**, 7369–7375.

**Toye B., Zhong G.M., Peeling R., Brunham R.C.** (1990) Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **58**, 3909-3913.

---

**Tsuchida S., Izumi T., Shimizu T., Ishikawa T., Hatayama I., Satoh K., Sato K.** (1987) Purification of a new acidic glutathione S-transferase, GSTYn1Yn1, with a high leukotriene-C4 synthase activity from the rat brain. *Eur. J. Biochem.* **170**, 159–164.

**Vargo, M.A., Colman R.F.** (2001) Affinity labelling of rat glutathione S-transferase isozyme 1-1 by 17 $\beta$ -iodoacetoxy-estradiol-3-sulfate. *J. Biol. Chem.* **276**, 2031–2036.

**Vargo M.A., Nguyen L., Colman R.F.** (2004) Subunit interface residues of glutathione S-transferase A1-1 that are important in the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry.* **43**, 3327-3335.

**Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A.** (2002) Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35523–35531.

**Wagner U., Edwards R., Dixon D.P., Mauch F.** (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* **49**, 515–532.

**Walker J., Crowley P., Moreman A.D., Barrett J.** (1993) Biochemical properties of cloned glutathione-S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 255–264.

**Wang M.C., Bohmann D., Jasper H.** (2003) JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Develop. Cell* **5**, 811–816.

**Weinander R., Ekstrom L., Raza H., Lundqvist G., Lindkvist B., Sun T.-S., Hebert H., Schmidt-Krey I., Morgenstern R.** (1996) *Glutathione S Transferases, Structure, Function and Clinical Implications* (Vermeulen, N. P. E., Ed.), Taylor & Francis, London, 49-56.

---

**Wiktelius E., Stenberg G.** (2007) Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* **406**, 115-123.

**Wilce M.C.J., Parker M.W.** (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta.* **1205**, 1-18.

**Xiao G., Liu S., Ji X., Johnson W.W., Chen J., Parsons J.F., Stevens W.J., Gilliland G.L., Armstrong R.N.** (1996) First sphere and second sphere electrostatic effects in the active site of a class mu glutathione transferase. *Biochemistry* **35**, 4753-4765.

**Yang Y., Cheng J.-Z., Singhal S.S., Saini M., Pandya U., Awasthi S., Awasthi Y.C.** (2001) Role of glutathione S-Transferases in protection against lipid peroxidation: overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 19220–19230.

**Yassin Z., Clemente-Jimenez M.J., Tellez-Sanz R., Garca-Fuentes L.** (2003) Salt influence on glutathione-Schistosoma japonicum glutathione S-transferase binding. [\*International Journal of Biological Macromolecules\*](#). **31**, 155-162

**Yassin Z., Ortiz-Salmerón E., García-Maroto F., Baron C., Garca-Fuentes L.** (2004) Implications of the ligandin binding site on the binding of non-substrate ligands to *Schistosoma japonicum*-glutathione transferase *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. **1698**, 227-237.

**Zhang J., Lou Y.J.** (2003) Relationship between activation of microsomal glutathione S-transferase and metabolism behavior of chlorambucil. *Pharmacol. Res.* **48**, 623–630.

**Zettl R., Schell J., Palme K.** (1994) Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3H]indole-3-acetic acid: identification of a glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 689-693.