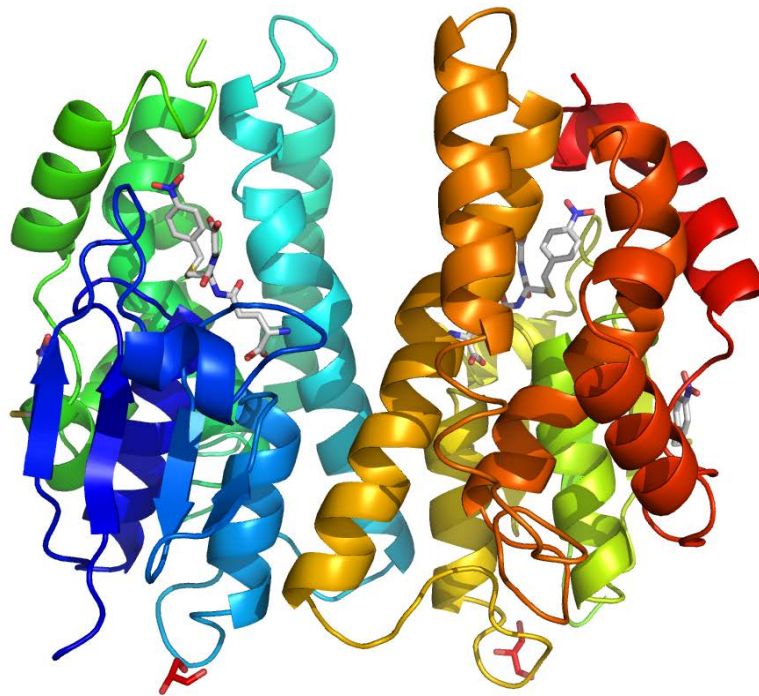


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος:

**Κλωνοποίηση, έκφραση και χαρακτηρισμός των ισοενζύμων
της μεταφοράς του γλουταθείου από
*Erwinia carotovora***



Ερευνητική Εργασία στα πλαίσια του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης
του
ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2012

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο ορισμός του θέματος και της πενταμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής έγινε με απόφαση της γενικής συνέλευσης ειδικής σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας που έλαβε χώρα στις 18/05/2007.

Η πενταμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

- 1) Λάμπρου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Άμεσος Επιβλέπων-Εισηγητής)
- 2) Κλώνης Ιωάννης, Καθηγητής (Μέλος)
- 3) Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής (Μέλος)
- 4) Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Μέλος)
- 5) Γεωργακόπουλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου, προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες, για την αμέριστη βοήθεια που μου έδωσαν, για την ομαλή συνεργασία που είχαμε και το πνεύμα αλληλεγγύης που καλλιεργήθηκε ανάμεσά μας, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νίκο Λάμπρου που με καθοδήγησε με γνώμονα το πώς θα στηριχθώ για να αποκομίσω τα μέγιστα δυνατά από τη δουλειά μου αυτή.

Θα ήθελα επίσης να επισημάνω την οικειότητα που με έκανε να νιώσω από την πρώτη στιγμή ο Καθηγητής Ιωάννης Κλώνης, όταν πρώτος με υποδέχτηκε στο Ίδρυμα αυτό.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

EDTA	Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
SDS	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη
TRIS	Τρις-υδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1. Τα ένζυμα Τρανσφεράσες της Γλουταθειόνης	3
1.2. Κατηγοριοποίηση των ενζύμων GSTs	4
1.3. Κυτοσολικές GSTs	6
1.3.1. Γενωμική οργάνωση.....	7
1.3.2. Γενική δομή και θεωρήσεις λειτουργίας των cGSTs.....	7
1.4. Kappa GSTs	13
1.5. Μικροσωμικές GSTs	15
1.5.1. Δομή και λειτουργία των μικροσωμικών GSTs.....	17
1.6. Μέθοδοι εύρεσης λειτουργίας των GST	19
1.7. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές	23
1.7.1. Κατευθυνόμενη εξέλιξη.....	24
1.7.1.α. Ορθολογική στρατηγική.....	24
1.7.1.β. Στοχαστική στρατηγική.....	26
1.7.2. Διαγονίδιακοί οργανισμοί ως προς GSTs.....	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	31
2.1. ΥΛΙΚΑ	32
2.2.ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ - ΟΡΓΑΝΑ	35
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1. Κατασκευή πηκτώματος αгарόζης για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA	38
3.2. Πρωτόκολλο της PCR	38
3.3. Ανάπτυξη της σε <i>E. carotovora subsp. Atroseptica</i>	40

3.4. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωματικού DNA.....	41
3.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (αλκαλική λύση).....	44
3.6. Λύση κυττάρων και παραλαβή τον ενζυμικού εκχυλίσματος.....	45
3.7. Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST.....	46
3.8. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford.....	47
3.9. Διαπίδυση – Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης.....	48
3.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	48
3.10.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	48
3.10.2. Προετοιμασία τον δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.....	50
3.10.3. Βαφή Coomassie Brilliant Blue R-250.....	50
3.11. Παρασκευή στήλης συγγένειας με ακινητοποιημένη GSH με βραχίονα 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα.....	51
3.12. Ένωση των προϊόντων PCR σε πλασμιδιακό φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> TOP10F' με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	52
3.13. Αρχές εξασφάλισης σωστού προσανατολισμού στην ένθεση του γονιδίου στον φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®].....	55
3.14. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> BL21 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και διαδικασία ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου GST σε αυτά.....	57
3.15. Διαδικασία ετερόλογης έκφρασης.....	57
3.16. Μακροπροθεσμη αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων.....	58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
4.1. Απομόνωση των διαφορετικων ισοτύπων των γονιδίων που κωδικοποιούν τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.....	60
4.1.1. Βιοϋπολογιστική ανάλυση.....	60
4.1.2. Απομόνωση γενωματικού DNA από <i>Erwinia carotovora</i>	63

4.1.3. Αντίδραση PCR για την απομόνωση και την ενίσχυση των γονιδίων των διαφορετικών ισοτύπων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από γενωματικό DNA.....	64
4.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR στον φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> TOP10F' με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	67
4.3. Προσδιορισμός ενεργότητας των διαφόρων ισοτύπων τρανσφεράσης της γλουταθειόνης μετά την ετερόλογη έκφραση στα κύτταρα <i>E. coli</i> BL21 DE3.....	69
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80

Περίληψη

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST) μπορούν να μεταβολίσουν πλήθος υποστρωμάτων κύρια σε διαδικασίες αποτοξίνωσης αλλά και σε πλήθος μεταβολικών διαδικασιών, κάτι που τους δίνει προοπτικές να αξιοποιηθούν σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές που άλλωστε πληθαίνουν τα τελευταία χρόνια. Το βακτήριο *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043 είναι πανταχού παρών φυπαθογόνο. Η επιτυχία του ως τέτοιο πιθανότατα οφείλεται σε ένζυμα που διαθέτει και το κάνουν ανθεκτικό στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, ανάμεσα στα οποία είναι και οι GSTs. Το βακτήριο αυτό εκφράζει τουλάχιστον έξι ισοτύπους GSTs, παρουσιάζοντας ενδιαφέρον από την άποψη αυτή. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε κατορθωτό να απομονωθούν τα έξι γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις GSTs από το γονιδίωμα του βακτηριακού αυτού στελέχους μέσω PCR. Ακολούθησε κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και ετερόλογη έκφρασή του σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Μετά απ' αυτήν προσδιορίστηκε φωτομετρικά η καταλυτική τους ικανότητα απέναντι στο υπόστρωμα CDNB. Έτσι πραγματοποιήθηκε το πρώτο βήμα για τη μελέτη των ενζύμων αυτών και την ενδεχόμενη βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τα ένζυμα Τρανσφεράσες της Γλουταθειόνης

Οι Τρανσφεράσες (μεταφοράσες) της Γλουταθειόνης (γλουταθείου) (GSTs) είναι μια υπεροικογένεια πολυλειτουργικών πρωτεϊνών με θεμελιώδεις ρόλους στην κυτταρική αποτοξίνωση μιας μεγάλης γκάμας εξωγενών και ενδογενών μεταβολιτών. Αν και αρκετές απ' αυτές δεν έχουν καθόλου δράση τρανσφεράσης, αυτές οι πρωτεΐνες συνεχίζουν να αποκαλούνται συνολικά GSTs, επειδή οι πρώτες που ανακαλύφθηκαν ήταν πράγματι τρανσφεράσες.

Στα φυτά και τα ζώα, οι GSTs είναι τα κύρια ένζυμα της φάσης II στις μεταβολικές διαδικασίες αποτοξίνωσης. Η κύρια τους αποστολή είναι να καταλύουν την ένωση του τριπεπτιδίου Γλουταθειόνη (γ-Glu-Cys-Gly ή GSH) με ηλεκτρονιόφιλους, συνήθως τοξικούς, μεταβολίτες ξενοβιοτικούς ή ενδογενείς για το σχηματισμό περισσότερο διαλυτών και λιγότερο τοξικών πεπτιδικών καταλοίπων. Κατόπιν αυτές οι ενώσεις της γλουταθειόνης είναι έτοιμες να επεξεργαστούν σε ενώσεις μερκαπτουρικού οξέος, να διασπαστούν περαιτέρω και τελικά να αποβληθούν από τα κύτταρα, διαδικασίες που αναλαμβάνουν τα ένζυμα της φάσης III.

Συγκεκριμένα οι GSTs καταλύουν την πυρηνόφιλη προσβολή από τη GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (R) μιας ένωσης, όπως φαίνεται στην παρακάτω χημική εξίσωση (Armstrong, 1998).



Η R μπορεί να είναι μια άλκυλ-, άλλυλ- ή και άρυλ- ομάδα η οποία ως ηλεκτρονιόφιλο κέντρο μπορεί να περιέχει υπεροξυ-ομάδες, άτομα οξυγόνου με ασύζευκτα ηλεκτρόνια (πχ ρίζες), αλδεϋδομάδες-κετονομάδες κ.α. Αυτό που πρακτικά συμβαίνει είναι η αναγωγή αυτών των ηλεκτρονιόφιλων κέντρων οξυγόνου με την ταυτόχρονη οξειδωση της θειολικής ομάδας (-SH) της GSH. Στην παραπάνω εξίσωση η X μπορεί να είναι μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ή ανόργανων ομάδων.

Επιπρόσθετα οι GSTs μπορούν να υπηρετήσουν ως υπεροξειδάσες, ισομεράσες και θειόλο-τρανσφεράσες ή να έχουν μη-καταλυτικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων να ενώνονται με μη-υποστρωματικά προσδέματα και να συμμετέχουν στη ρύθμιση μεταγωγής σήματος. Τέλος οι ρόλοι τους εκτείνονται σε διάφορες άλλες μεταβολικές πορείες, όπως στη βιοσύνθεση λευκοτριενίων και προσταγλανδινών καθώς και στον καταβολισμό αρωματικών αμινοξέων.

1.2. Κατηγοριοποίηση των ενζύμων GSTs

Γενικά αναγνωρίζονται 3 κύριες υποοικογένειες GSTs που καθεμιά κωδικοποιείται από ξεχωριστές πολυγονιδιακές οικογένειες:

- 1) Οι διαλυτές ή κυτοσολικές GSTs που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως κανονικές.
- 2) Οι μικροσωμικές GSTs που ονομάζονται MAPEG, δηλαδή σχετιζόμενες με τις μεμβράνες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των εικοσανοειδών και της γλουταθειόνης.
- 3) Οι GSTs που κωδικοποιούνται από πλασμίδια βακτηρίων και εμπλέκονται στην αντίσταση κατά της φωσφομυκίνης και άλλων αντιβιοτικών.

Μια διάκριση που χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις είναι αυτή μεταξύ των GSTs που εκφράζονται στους ευκαρυωτικούς και των GSTs που εκφράζονται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι ευκαρυωτικές GSTs περιλαμβάνουν τη μεγάλη πλειοψηφία των μελών των υποοικογενειών των κυτοσολικών, των Kappa (αναφέρονται παρακάτω) και των μικροσωμικών GSTs. Στις GSTs των βακτηρίων περιλαμβάνονται περίπου το 15% των μέχρι τώρα χαρακτηρισμένων κυτοσολικών, περίπου το 30% των φερόμενων ως μικροσωμικών και οι πλασμιδιακές GSTs.

Πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν πως οι GSTs κλάσης Kappa, που παλαιότερα θεωρούνταν απλώς ως μια κλάση των διαλυτών GSTs, αποτελούν μια διακριτή υποοικογένεια (Jowsey et al., 2003; Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004).

Οι μικροσωμικές GSTs είναι εξαιρετικά ετερογενείς. Μάλιστα έχουν ταυτοποιηθεί μικροσωμικές GSTs με πρωτογενή και τριτογενή δομή περισσότερο όμοια με αυτή των διαλυτών, κλάσης A, GSTs παρά με αυτή των άλλων μικροσωμικών.

Είναι, λοιπόν, πιθανό ότι ο αριθμός των υποοικογενειών των GSTs να είναι μεγαλύτερος από αυτόν που μέχρι τώρα θεωρείται. Ακόμα παραπέρα, γενωμικές και μεταγενωμικές μελέτες τονίζουν συνεχώς την ύπαρξη δεσμών με «σχετιζόμενες οικογένειες» πρωτεϊνών των οποίων τα όρια με τις GSTs μπορεί να είναι αρκετά λεπτά και δυσδιάκριτα. Αυτές οι GST-σχετιζόμενες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις γλουταρεδοξίνες (GRX) (Xia et al., 2001; Collison and Grant, 2003), τα διακυτταρικά κανάλια χλωρίου (CLIC) (Cromer et al., 2002), τις δεϋδροασκορβικο-ρεδουκτάσες (DHAR) (Dixon et al., 2002), τις σεληνοκυστεϊνικές υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (SecGPX) (Epp et al., 1983), την βακτηριακή DsbA (Martin et al., 1993) και τους ευκαρυωτικούς παράγοντες επιμύκησης (eEF1B γ) (Jeppesen et al., 2003). Όλες αυτές μοιράζονται με τις GSTs ένα βασικό δομικό μοτίβο, την πτυχή της θειορεδοξίνης.

Τέλος οι βακτηριακές GSTs μέχρι τώρα έχουν χαρακτηριστεί λιγότερο σε σχέση με τις άλλες GSTs, ειδικά σε ότι αφορά τις λειτουργίες τους και την επέκτασή τους στα διάφορα βακτηριακά είδη. Η μεγάλη πλειοψηφία των βακτηριακών GSTs που έχουν μέχρι τώρα ερευνηθεί αφορούν στην κατάλυση εξειδικευμένων αντιδράσεων σε μονοπάτια καταβολισμού ενδογενών, κυρίως, χημικών ουσιών (Vuilleumier 1997). Οι αρχικά χαρακτηρισμένες βακτηριακές GSTs εμφανίζουν μικρή δραστηριότητα απέναντι στη μεγάλη ποικιλία των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών που μπορούν να ενωθούν με τη γλουταθειόνη στις ευκαρυωτικές GSTs όπως αλογονιδιομένα αρωματικά και αλειφατικά σύμπλοκα, υπεροξειδία και εποξειδία, α , β -ακόρεστα καρβονυλικά σύμπλοκα, ισοθειο-εστέρες του κυανιδικού οξέως και δισουλφίδια μικρού μοριακού βάρους (Hayes and Pulford 1995). Τα συσσωρευμένα όμως αποτελέσματα των ερευνών που έχουν ακολουθήσει σε σχέση με τις GSTs των βακτηρίων, φαίνεται να ανατρέπουν την άποψη αυτή, ενώ υπάρχει και έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για αυτές.

1.3. Κυτοσολικές GSTs

Αυτή η υποοικογένεια που απαντάται ευρέως σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς είναι κατά πολύ η πιο άφθονη και συχνά αριθμεί δεκάδες μέλη σε κάθε είδος. Για παράδειγμα, έχουν ταυτοποιηθεί 15-20 διαφορετικά γονίδια GSTs στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά, 40-60 στα φυτά, 10-15 στα βακτήρια και πάνω από 10 στα έντομα.

Βασιζόμενοι σε διάφορα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων της ομοιότητας αμινοξικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, της φυσικής δομής των γονιδίων (πχ θέση και αριθμός εσωνίων) και ανοσολογικών ιδιοτήτων, οι κυτοσολικές GSTs έχουν ομαδοποιηθεί σε πολυάριθμες κλάσεις, μερικές από τις οποίες έχουν ευρεία διάδοση, ενώ άλλες απαντούν σε συγκεκριμένα είδη.

Προς το παρόν έχουν αναγνωρισθεί στα θηλαστικά 7 κλάσεις cGSTs, δηλαδή οι ειδικές κλάσεις Alpha (A), Mu (M), Pi (Π) και οι κοινές Sigma (Σ), Theta (Θ), Zeta (Z) και Omega (Ω). Τα φυτά έχουν 6 κλάσεις, τις ειδικές Lambda (Λ), Phi (Φ), Tau (T) και DHAR (δεϋδρο-ασκορβικό-ρεδουκτάσες) και τις κοινές Theta και Zeta, ενώ 5 κλάσεις έχουν αναγνωρισθεί στα έντομα, η ειδική Delta (Δ) και οι κοινές Sigma, Theta, Zeta και Omega. Στα βακτήρια η εικόνα είναι λιγότερο καθαρή. Βέβαια έχουν μια ειδική κλάση, την Beta (B), καθώς και άλλα ένζυμα σχετιζόμενα περισσότερο με τις Theta και πιθανώς με άλλες κλάσεις. Πρόσφατα ανακοινώθηκε μια νέα ειδική κλάση των βακτηρίων, η Chi (X) (Wiktelius et al., 2007).

Σχεδόν όλες οι διαλυτές GSTs είναι ενεργές ως διμερή, είτε ως ομοδιμερή, είτε ως ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός περιορίζεται σε υπομονάδες ίδιας κλάσης. Πάντως έχουν αναφερθεί σπάνια μονομερή ένζυμα κυρίως από τις φυτικές κλάσεις Lambda και DHAR. Τα μονομερή ένζυμα στερούνται GSH-εξαρτώμενης συζευκτικής ικανότητας και δράσης υπεροξειδάσης με τυπικά υποστρώματα (Dixon et al., 2002). Παρόλα αυτά, θεωρούνται GSTs στη βάση της αλληλουχικής και δομικής

ομοιότητάς τους και επειδή μοιράζονται κάποιες άλλες κλασικές για GSTs καταλυτικές ιδιότητες, όπως τη δραστικότητα μεταφοράς της θειόλης.

1.3.1. Γενωμική οργάνωση

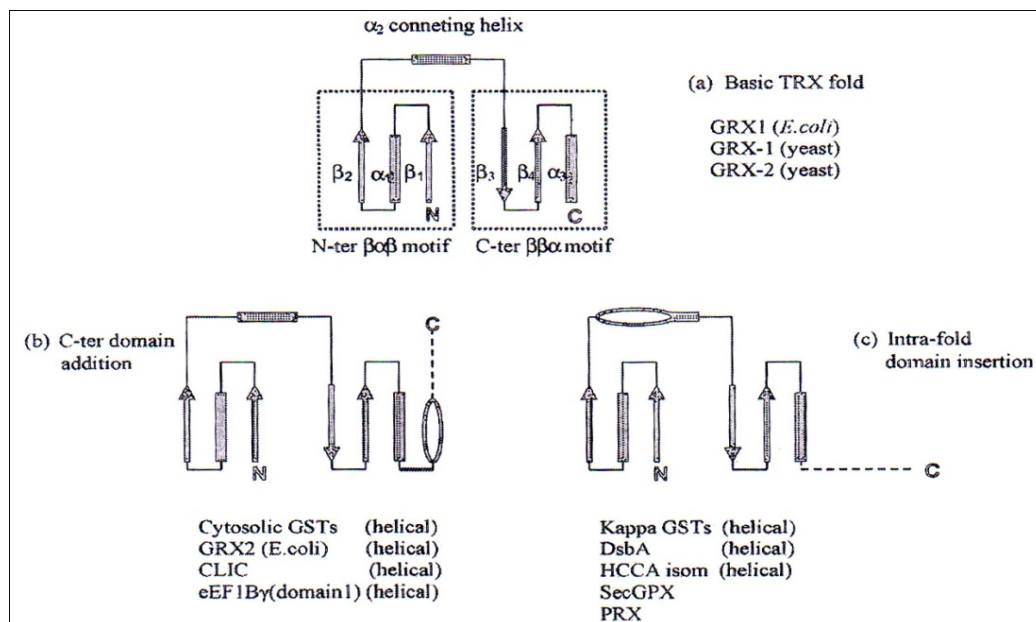
Η ολοκλήρωση διαφόρων γενωμικών διαδικασιών αλληλούχισης καθώς και της εξέλιξης ισχυρών εργαλείων βιοπληροφορικής, έχει οδηγήσει σε εκτενείς αναφορές νέων γονιδίων και κατασκευή φυσικών χαρτών που αποκάλυψαν την διασπορά των γονιδίων στο γονιδίωμα ολοένα αυξανόμενου αριθμού οργανισμών. Τα περισσότερα γονίδια GST φαίνεται να σχηματίζουν σφιχτές γονιδιακές συστάδες συνήθως της ίδιας κλάσης. Πχ τα ανθρώπινα γονίδια A, M και Θ κλάσης ή τα Π γονίδια ποντικού ομαδοποιούνται σε ειδικές και περιορισμένες χρωμοσωμικές περιοχές. Τα γονίδια των βακτηριακών GST καταλαμβάνουν παρακείμενες θέσεις σε οπερόνια ή συστάδες γονιδίων που εμπλέκονται σε ειδικά καταβολικά μονοπάτια.

1.3.2. Γενική δομή και θεωρήσεις λειτουργίας των cGSTs

Οι διαλυτές GSTs είναι κατά κανόνα βιολογικά ενεργές ως διμερή υπομονάδων βάρους 23-30 kDa και με μέσο μήκος 200-250 αμινοξέα. Οι ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία μέσα στην ίδια κλάση είναι τυπικά λίγο μεγαλύτερες από 40%, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν έχουν βρεθεί και άλλοι βαθμοί ομοιότητας. Ανάμεσα σε διαφορετικές κλάσεις οι ομοιότητες είναι σημαντικά μικρότερες, σχεδόν 25% στα θηλαστικά και 20% στα φυτά.

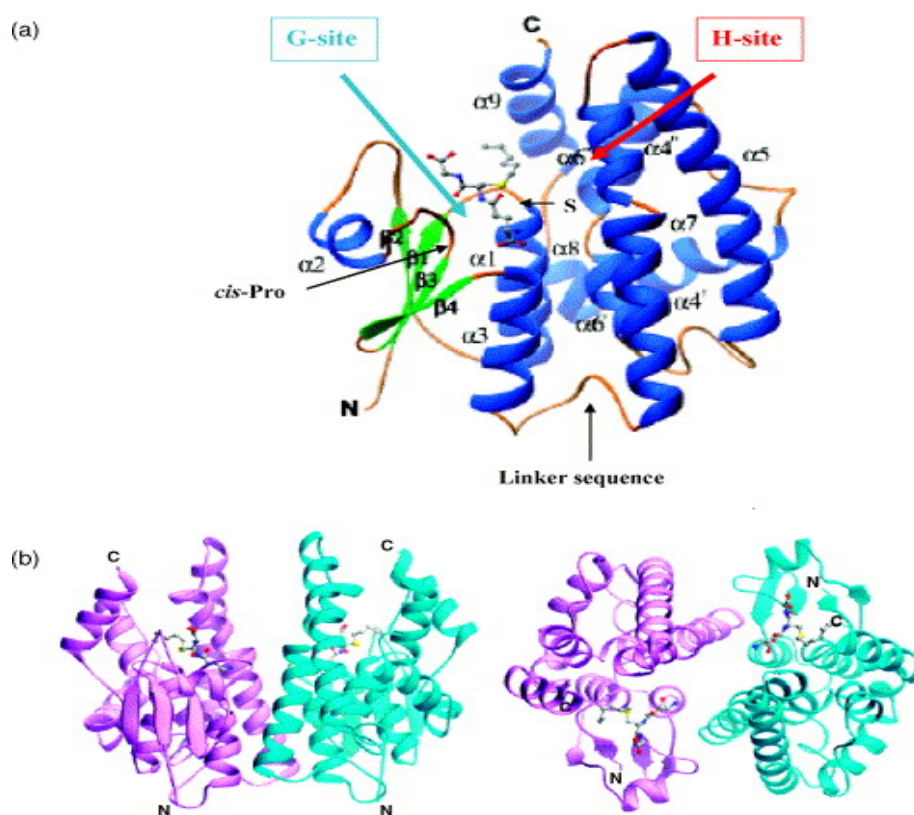
Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί οι κρυσταλλικές δομές περίπου 20 διαλυτών GSTs που ανήκουν στις κύριες φυτικές, ζωικές και βακτηριακές κλάσεις. Η ανάλυσή τους δηλώνει σαφώς πως, παρά τη προφανή συνολική αλληλουχική απόκλιση, όλες οι GST πρωτεΐνες δείχνουν χτυπητά επίπεδα δομικής συντηρητικότητας, δείχνοντας κοινή τρισδιάστατη αναδίπλωση και διμερή οργάνωση.

Κάθε υπομονάδα αποτελείται από δύο χωρικά διακριτές επικράτειες. Μία αμινοτελική αποτελούμενη από β-αλυσίδες και α-έλικες (επικράτεια I) και μια ολοελικοειδή καρβοξυτελική (επικράτεια II). Η **επικράτεια I** υιοθετεί μια θειορεδοξινική (TRX) αναδίπλωση (βαβαββα) που αποτελείται από δυο δομικά μοτίβα, ένα αμινοτελικό βαβ και ένα καρβοξυτελικό ββα, που μεταξύ τους συνδέονται από ένα μακρύ βρόχο που περιέχει α-έλικα. Συνολικά σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια από τρεις παράλληλες ($\beta_1\beta_2\beta_4$) και μια αντιπαράλληλη (β_3) β-αλυσίδες. Η επιφάνεια αυτή βρίσκεται ανάμεσα στην α_2 έλικα από τη μια πλευρά και τις α_1 - α_3 έλικες στην άλλη πλευρά. Η έλικα α_2 και η β_3 αλυσίδα συνδέονται μέσω μιας λούπας που περιέχει μια *cis*-προλίνη, κάτι που είναι υψηλά συντηρημένο σε όλες τις GSTs. Αυτή η λούπα μπορεί να μην εμπλέκεται απευθείας στην κατάλυση, όμως είναι σημαντική στη διατήρηση μιας καταλυτικά ικανής δομής για την GST (Allocati et al., 1999). Η **επικράτεια II** αποτελείται από έναν κυμαινόμενο αριθμό (4-7) α-ελίκων που τοποθετούνται καθοδικά της TRX δομής και συνδέονται με αυτήν μέσω μιας κοντής αλληλουχίας 10 περίπου αμινοξέων. (σχήμα 1.1)



Σχήμα 1.1: Διάγραμμα των δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνών TRX. Τα βέλη υποδεικνύουν τις β-αλυσίδες ενώ τα ορθογώνια τις α-έλικες. Τα οβάλ σχήματα υποδεικνύουν τη θέση της επικράτειας II. Η φύση της επικράτειας II περιγράφεται στην παρένθεση δίπλα στα ονόματα των πρωτεϊνών (b και c).

Κάθε υπομονάδα διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης της γλουταθειόνης (**G-site**) αποτελούμενη από αμινοξικά κατάλοιπα της επικράτειας I και μια υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης του ηλεκτρονιόφιλου υποστρώματος (**H-site**) αποτελούμενη κυρίως από κατάλοιπα με μη πολικές πλάγιες ομάδες της επικράτειας II. Και οι δύο πλευρές (G- & H-sites) συγκροτούν από κοινού μία καταλυτικά ενεργή πλευρά. Η αμινοτελική δομή είναι αρκετά συντηρημένη και περιέχει ειδικά κατάλοιπα κρίσιμα για τη σύνδεση της γλουταθειόνης και τη γενικότερη καταλυτική δράση. (Σχήμα 1.2)



Σχήμα 1.2: Διάγραμμα του μονομερούς της TaGSTU4 T-κλάσης από σιτηρά (a) και 2 απόψεις του διμερούς της TaGSTU4. Οι α-έλικες παριστάνονται ως ελικοειδείς κορδέλες και οι β-αλυσίδες ως ταινιώδη βέλη. Ο αναστολέας S-εξυλο-γλουταθειόνη (για να περιγραφεί ο τρόπος σύνδεσης της GSH) παριστάνεται με τη δομή τύπου μπίλια-αξονας σύμφωνα με τον ατομικό της τύπο. Τα λεπτά βέλη δείχνουν τη θέση του καταλυτικού καταλοίπου σερίνης (S), του καταλοίπου cis-Pro στην αντίστοιχη λούπα ανάμεσα στην α2-έλικα και β3-αλυσίδα και την κοντή αλληλουχία που συνδέει τις δύο επικράτειες. Στο (b) φαίνεται ο διπτυχωτός άξονας ανάμεσα στα δύο μονομερή από δύο κάθετες μεταξύ τους απόψεις και η ρωγμή σχήματος V. (Thom et al., 2002)

Υψηλά συντηρητική είναι η Tyr7 στις κλάσεις A, M και Π των θηλαστικών και η Ser17 των πανταχού παρόντων Θ και Z, των φυτικών Φ και των GSTs Δ κλάσης. Αυτά τα κατάλοιπα έχουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ενζύμου, καθώς το υδροξύλιο της σερίνης ή της τυροσίνης δρα ως δότης δεσμού υδρογόνου με τη θειολική ομάδα της GSH, προωθώντας τη δημιουργία και τη σταθεροποίηση ενός ισχυρά δραστικού θειολικού ανιόντος το οποίο μπορεί πράγματι να πραγματοποιήσει πυρηνόφιλη επίθεση στο εκάστοτε ηλεκτρονιόφιλο υπόστρωμα (Dirr et al., 1994). Ο σημαντικός ρόλος αυτών των καταλοίπων επιβεβαιώθηκε από στοχοπροσηλωμένες μεταλλάξεις της τυροσίνης διαφόρων κλάσεων ενζύμων. Σε όλες τις περιπτώσεις χάθηκε η καταλυτική ικανότητα του ενζύμου (Dirr et al., 1994; Caccuri et al., 1997; Thom et al., 2002).

Μερικές κλάσεις GST έχουν αντί μιας σερίνης ή τυροσίνης, μια κυστεΐνη στην ίδια G-site. Αυτό το κατάλοιπο με τη θειολική του ομάδα προωθεί το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της θειολικής ομάδας της GSH και άλλων υποστρωμάτων, παρά τη δημιουργία ενός θειολικού ανιόντος. Αυτό είναι χαρακτηριστικό των κλάσεων Ω, Β και Λ καθώς και των, σχετιζόμενων με τις GST, οικογενειών των DHARs, GRX και CLICs. Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν φτωχή, αν όχι μηδενική, συζευκτική δραστηριότητα με την GSH και αντ' αυτού εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Ενώ οι Λ, DHARs, GRX και CLICs είναι βιολογικά ενεργά ως μονομερή, οι Ω και Β κλάσεις είναι διμερή. Οι Ω υπάρχουν σε αρκετά θηλαστικά, έντομα και νηματώδεις. Όπως οι GRX, έχουν δράση GSH-εξαρτώμενης θειολικής μεταφοράς και μπορούν επίσης να καταλύσουν τη δεϋδρο-ασκορβική αναγωγή. Όμως η συζευκτική με την GSH δραστηριότητα είναι αμελητέα (Board et al., 2000). Σε ότι αφορά τις GST Β κλάσης, μελέτες στο αντίστοιχο ένζυμο από τον *Proteus* έδειξαν ότι επιδεικνύει τόσο συζευκτική δραστηριότητα όσο και οξειδοαναγωγική δράση απέναντι σε δισουλφίδια. Η Cys10 είναι σημαντική για την οξειδοαναγωγική δράση αλλά όχι για την σύζευξη με την GSH. Για αυτά τους τα χαρακτηριστικά, οι Β θεωρούνται ως ενδιάμεσα ένζυμα που γεφυρώνουν το εξελικτικό μονοπάτι από τις θειολο-δισουλφιδικές οξειδοαναγωγάσες στις μεταφορές της γλουταθειόνης (Caccuri et al., 2002).

Η καρβοξυτελική περιοχή, αντίθετα με την αμινοτελική, ποικίλει τόσο σε αλληλουχία όσο και σε τοπολογία με αποτέλεσμα να καθορίζονται με συγκεκριμένο τρόπο οι άφθονες και διακριτές μεταξύ τους υδροφοβικές ιδιαιτερότητες με το κάθε υπόστρωμα που παρατηρούνται στα διάφορα ένζυμα.

Κάθε υπομονάδα των διμερών GST είναι καταλυτικά ανεξάρτητη καθώς διαθέτει τόσο G- όσο και H-site. Όμως πέρα των προαναφερόμενων εξαιρέσεων, όλες οι καταλυτικά ενεργές GSTs που βρίσκονται στη φύση είναι διμερή. Οι λόγοι αυτής της αντίφασης παρέμεναν για πολύ καιρό σκοτεινοί και μόνο πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να φωτίζουν τη μοριακή βάση του διμερισμού και τους λόγους για τους οποίους αυτός έχει τόσο υψηλά διατηρηθεί στη διαδικασία της εξέλιξης. Σε όλες τις διμερείς GSTs οι δύο υπομονάδες σχετίζονται μέσω ενός διπτυχωτού άξονα (σχήμα 1.2). Οι κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων συμβαίνουν μεταξύ της επικράτειας I της μιας και της επικράτειας II της άλλης υπομονάδας. Διαφορετικοί τύποι αλληλεπιδράσεων διαπλέκονται στην συναρμολότητα και διατήρηση της τεταρτοταγής διαμόρφωσης. Στις Θ, Β, Γ και Σ οι αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως υδρόφιλες, ενώ στις Α, Μ, Π, Ω και Φ οι αλληλεπιδράσεις διμερισμού είναι υδρόφοβες (όπως και οι επιφάνειες των πρωτεϊνικών υπομονάδων που εμπλέκονται).

Μια σημαντική υδροφοβική αλληλεπίδραση στις Α, Μ, Π και Φ GSTs αποκαλύπτεται σε ένα μοτίβο κλειδιού-κλειδαριάς. Σε αυτό η πλάγια ομάδα ενός αρωματικού αμινοξέος (συνήθως φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη) αποτελεί το κλειδί που ξεπροβάλλει από τη λούπα που προηγείται της β3 αλυσίδας της επικράτειας I της μιας υπομονάδας. Αυτό το κλειδί προσαρμόζεται σε μια υδρόφιλη κοιλότητα (θήκη) που σχηματίζεται από τις α4 και α5 έλικες της επικράτειας II της άλλης υπομονάδας (Armstrong et al., 1997; Hegazy et al., 2004). Μετάλλαξη αυτού του καταλοίπου στις ανθρώπινες GSTP1-1, GSTA1-1 και GSTM1-1 οδηγεί σε περιορισμένο διμερισμό ή/και αποσταθεροποίηση του διμερούς και περιορισμένη καταλυτική δράση (Hornby et al., 2002).

Στην περίπτωση της πρώτης εξ' αυτών, ο διμερισμός θεωρείται πως σταθεροποιεί την τριτοταγή δομή κάθε υπομονάδας και αποτελεί τη δομική βάση της συνεργασίας ανάμεσα στις δύο υπομονάδες για την πρόσδεση της GSH (Caccuri et al., 1999). Αργότερα (Hegazy et al, 2004) δείχθηκε πως οι δύο δραστικές πλευρές της GSTP1-1 λειτουργούν συνεργατικά. Από μετάλλαξη της Tyr50 σε αλανίνη δημιουργήθηκε η υπομονάδα Y50A, που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία μιας ομοδιμερούς μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Y50A/Y50A και μιας ετεροδιμερούς Y50A/GSTP1-1, δηλαδή με μια άγριου τύπου υπομονάδα. Χρησιμοποιώντας το τυπικό υπόστρωμα CDNB, βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο ομοδιμερές ήταν πρακτικά ανενεργό, αφού είχε χιλιάδες φορές μικρότερη ενεργότητα από το φυσιολογικό ομοδιμερές. Επίσης το ετεροδιμερές βρέθηκε να έχει 27 φορές μικρότερη ενεργότητα από το φυσιολογικό ένζυμο, αν και θα αναμενόταν μόνο 2 φορές αν οι δύο υπομονάδες λειτουργούσαν πράγματι ανεξάρτητα. Αυτό αποδεικνύει ότι η διμερής οργάνωση αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητα του συγκεκριμένου ενζύμου, πράγμα που συνηγορεί στη συνεργατική λειτουργία των δύο υπομονάδων του. Πρόσφατα παρόμοια μοτίβα κλειδιού-κλειδαριάς, αν και λιγότερο μελετημένα, βρέθηκαν και σε άλλες κυτοσολικές GSTs.

Στα περισσότερα διμερή GST παρατηρείται μια εξωτερική, σχετικά βαθιά, σχήματος V ρωγμή (σχήμα 1.2) ανάμεσα στις δύο υπομονάδες και μια κρυμμένη περιοχή μήκους 2700-3400 Angstrom. Στις Θ, Ω και Κ GSTs η ρωγμή είναι περισσότερο ανοιχτή και η κρυφή περιοχή περιορισμένη. Το άνοιγμα της ρωγμής και η πολικότητα της H-site κάθε υπομονάδας επιδρούν στις λειτουργικές ιδιαιτερότητες κάθε ενζύμου. Για παράδειγμα, οι Ω έχει βρεθεί ότι μπορούν να προσδέσουν πολύ μεγάλα και σχετικά υδρόφιλα υποστρώματα, πχ άλλες πρωτεΐνες. Δεδομένης της παρουσίας της κυστεΐνης ως ενεργό κατάλοιπο στη G-site, είναι κατανοητό ότι οι Ω GSTs παίζουν ρόλο στην αναγωγή με GSH ή κυστεΐνη S-θειολικών μορίων που δημιουργούνται από διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες σαν επακόλουθο οξειδωτικού στρες (Board et al, 2000). Επίσης έχει προταθεί για τις Κ GSTs η πρόσδεσή τους σε άλλες πρωτεΐνες ως μέρος της λειτουργίας τους (Ladner et al., 2004).

1.4. Kappa GSTs

Τα πρώτα ίχνη αυτού που τώρα φαίνεται ως μία διακριτή υποοικογένεια GSTs χρονολογούνται από το 1991, όταν ένα ένζυμο GST απομονώθηκε από το μάτριξ υπατικών μιτοχονδρίων αρουραίου (Harris et al, 1991). Το ένζυμο αυτό τοποθετήθηκε αρχικά στις GSTs Θ κλάσης στη βάση περιορισμένης ανάλυσης της αμινοτελικής αλληλουχίας. Με τον πλήρη καθορισμό της αλληλουχίας του cDNA και της πρωτεΐνης, επισημάνθηκαν σημαντικές διαφορές με τις άλλες γνωστές GSTs θηλαστικών και γι αυτό εισήχθη μια νέα κλάση, η K, προκειμένου να τοποθετηθεί αυτό το ένζυμο. Επίσης αναφέρθηκαν και άλλα, ανθρώπινα και χοιρινά ομόλογα, παρόλο που δεν χαρακτηρίστηκαν.

Η μοριακή κλωνοποίηση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός K GSTs από ποντικό και άνθρωπο καθώς και ο τρισδιάστατος καθορισμός της δομής των ενζύμων αυτών των δύο οργανισμών πρόσθεσαν νέα στοιχεία για την αποσαφήνιση αυτής της νέας υποοικογένειας GSTs (Jowsey et al., 2003; Robinson et al., 2004; Ladner et al, 2004). Όλα τα K ένζυμα θηλαστικών κωδικοποιούνται από γονίδια ενός αντιγράφου, με υψηλή ομοιότητα ανάμεσα στα τρία αυτά είδη (αρουραίος, χοίρος, άνθρωπος) τόσο στην αμινοξική αλληλουχία (περίπου 70%) όσο και στην οργάνωσή τους: όλα τα γονίδια αποτελούνται από οχτώ εξώνια και επτά εσώνια σε συντηρημένες θέσεις (Jowsey et al., 2003). Συγκριτικές έρευνες σε EST βάσεις δεδομένων έχουν αποκαλύψει όμοιες αλληλουχίες από *B. taurus*, *S. scrofa*, *G. gallus*, *X. laevis*, *C. elegans*, ενώ τρανσφεράσες της γλουταθειόνης σχετιζόμενες με τα K ένζυμα βρέθηκαν επίσης σε βακτήρια (Vuilleumier and Pagni, 2002). Φαίνεται πως η παρουσία τους σε εξελικτικά μακρινά είδη προτάσσει μια θεμελιώδη και συντηρητική βιολογική λειτουργία που ενδεχομένως έχουν.

Τα K ένζυμα παρουσιάζουν GSH-εξαρτώμενη δραστηριότητα σύζευξης και δραστηριότητα υπεροξειδάσης με τυπικά υποστρώματα, γι' αυτό μοιράζονται κοινά καταλυτικά χαρακτηριστικά με τις τυπικές GSTs.

Τα γονίδια των K GSTs έχουν ένα πλατύ ιστοειδικό προφίλ έκφρασης και βρίσκονται συνήθως στα μιτοχόνδρια και όχι στο κυτταρόπλασμα (Jowsey et al., 2003). Επιπρόσθετα, το ανθρώπινο ένζυμο έχει ανιχνευθεί επίσης στα υπεροξυσωμάτια. Από τη στιγμή που τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσωμάτια εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και είναι κυτταρικές θέσεις όπου παράγονται μεγάλες ποσότητες αντιδραστικού οξυγόνου (πχ ρίζες), η τοποθέτηση των ανθρώπινων K GSTs και στα δύο οργανίδια προτείνει για αυτές ένα ρόλο στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και στην αποτοξίνωση από λιπιδικά υπεροξειδία.

Συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών υποδεικνύουν ότι τα K ένζυμα δεν μοιράζονται σημαντική συνολική ομολογία με καμία από τις άλλες κλάσεις GSTs, είναι όμως κοντύτερα στην DsbA της *E. coli*, μία ισομεράση του δισουλφιδικού δεσμού, και στη βακτηριακή HCCA ισομεράση, μια GSH-εξαρτώμενη οξειδοαναγωγή που εμπλέκεται στην αποδόμηση της ναφθαλίνης (Robinson et al., 2004; Ladner et al, 2004). Επίσης και η δευτεροταγής δομική τοπολογία των K GSTs έχει περισσότερες ομοιότητες με τα δύο αυτά βακτηριακά ένζυμα παρά με τις κυτταροπλασματικές GSTs. Ενώ στις τελευταίες η ελικοειδής επικράτεια II τοποθετείται καθοδικά της πτυχής της θειορεδοξίνης, στις K GSTs, DsbA και HCCA αυτή εισέρχεται μέσα στη θηλιά, ανάμεσα στο αμινοτελικό (βαβ) και καρβοξυτελικό (ββα) μοτίβο. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες να υποθέσουν πως η εξελικτική πορεία των K GSTs διαφοροποιείται από των κυτοσολικών (Robinson et al., 2004; Ladner et al, 2004).

Όμως παρά την αμινοξική απόκλιση με τις κανονικές GSTs, είναι δυνατή μια αντιστοίχιση των δευτεροταγών δομικών στοιχείων της θειορεδοξικής θηλιάς. Όταν οι συγκρίσεις περιορίζονται στα βαβ και ββα μοτίβα, οι ανθρώπινες K GSTs (hGSTK) μοιάζουν περισσότερο στις GSTs Θήτα κλάσης απ' ότι στις GSTs άλλων κλάσεων και στη DsbA. Επιπρόσθετα, τα διμερή K ένζυμα ανθρώπου και αρουραίου έχουν σχήμα ανοιχτής πεταλούδας απ' όπου λείπει η βαθιά ρωγμή σχήματος V ανάμεσα στις δύο υπομονάδες, όπως ακριβώς και στις GSTs Θ κλάσης (Robinson et al., 2004; Ladner et al, 2004).

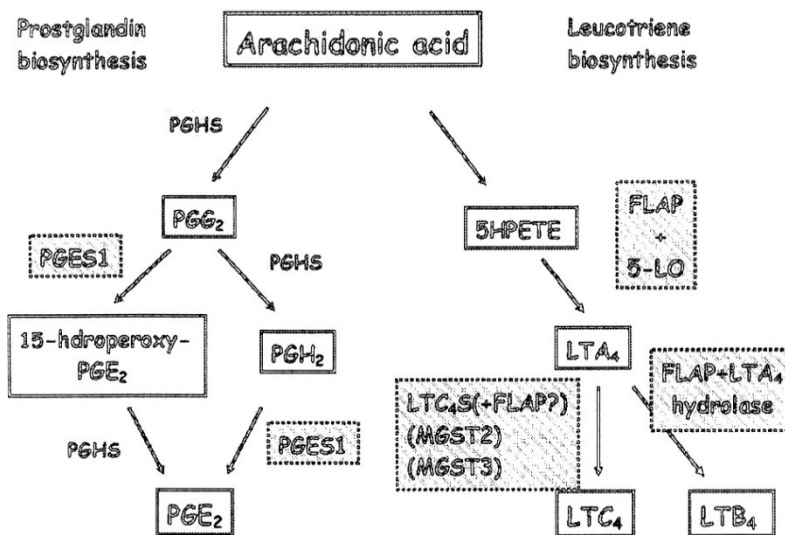
1.5. Μικροσωμικές GSTs

Οι μικροσωμικές GSTs, που πλέον αποκαλούνται MAPEG, είναι επίσης πανταχού παρούσες με καλά καταγεγραμμένη παρουσία σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, καταλαμβάνοντας όλες τις θέσεις της εξελικτικής κλίμακας (Bressel et al., 2005). Όμως αριθμητικά είναι λιγότερες από τις κυτοσολικές GSTs και πολύ λιγότερο χαρακτηρισμένες, με εξαίρεση τις MAPEG θηλαστικών.

Οι περισσότερες MAPEG εμπλέκονται στη σύνθεση εικοσανοϊδών, λευκοτριενίων και προσταγλανδινών καταλύοντας αντιδράσεις GSH-εξαρτώμενης μεταφοράς ή ισομεράσης. Άλλες έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η πρώτη MAPEG που χαρακτηρίστηκε το 1982, η ανθρώπινη MGST1, επιδεικνύει καταλυτικές δράσεις περισσότερο συνηθισμένες για τις κυτοσολικές GSTs. Καταλύει τη σύζευξη της γλουταθειόνης σε πολλά αλογονοειδή υποστρώματα, μεταξύ τους και το CDNB, καθώς και σε διάφορους πολυαλογονιδιομένους ακόρεστους υδατάνθρακες. Μαζί με αυτήν τη δράση μεταφοράς, η MGST1 πιστεύεται ότι είναι κυρίως ένα ένζυμο αποτοξίνωσης που εμπλέκεται στην κυτταρική άμυνα ενάντια στα τοξικά ξеноβιοτικά όπως επίσης και ενάντια σε μεταβολίτες που παράγονται ως επίπτωση οξειδωτικού στρες.

Για πολύ καιρό η MGST1 ήταν η μόνη χαρακτηρισμένη MAPEG. Αργότερα ταυτοποιήθηκαν και άλλες MAPEG όπως η συνθάση του λευκοτριένιου C₄ (LTC₄S), η πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την 5-λιποξυγενάση (FLAP) και η συνθάση-1 της προσταγλανδίνης E (PGES1). Η FLAP είναι μια μη καταλυτική πρωτεΐνη που προσδένεται μη ενζυματικά στο αραχιδονικό οξύ και απαιτείται για να ενεργοποιήσει την 5-λιποξυγενάση, το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένιο A₄ (LTA₄). Η FLAP φαίνεται να εμπλέκεται επίσης στη σύνθεση του λευκοτριένιου B₄ (Mandal et al., 2004). Η LTC₄S έχει δράση μεταφοράς της γλουταθειόνης και καταλύει τη σύνθεση του λευκοτριένιου C₄ (LTC₄) από την LTA₄ και την ανηγμένη γλουταθειόνη. Η PGES1, που παλαιότερα ονομαζόταν MGST1-L1 λόγω της ομολογίας της με τη MGST1,

έχει ελάχιστη δράση μεταφοράς της γλουταθειόνης με το LTC₄ ή το CDNB. Σε αντίθεση όμως με τη LTC₄S και την FLAP που δεν έχουν δράση υπεροξειδάσης, η PGES1 δύναται να ανάγει κουμανικό υδρο-υπεροξείδιο και άλλα υποστρώματα (Thoren et al., 2003). Όμως η κύρια δράση της PGES1 είναι να καταλύει την GSH-εξαρτωμένη ισομερίωση του PGD₂ σε PGE₂ (σχήμα 1.3). Επίσης έχουν προταθεί επιπρόσθετοι ρόλοι για τη PGES1 στην εξέλιξη του καρκίνου, την απόπτωση των κυττάρων και τη νόσο του Alzheimer λόγω της ισχυρής της αυξορρύθμισης από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 τόσο σε μια κυτταρική σειρά για τον καρκίνο του παχέος εντέρου όσο και σε αστροκύτταρα αρουραίου παρουσία του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου.



Σχήμα 1.3: Εμπλοκή των MAPEG στα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων και προσταγλανδινών.

Έρευνες βιοπληροφορικής στην EST βάση δεδομένων του ανθρώπου οδήγησαν στην ταυτοποίηση δύο ακόμα MAPEG, των MGST2 και MGST3 (Jacobsson et al., 1996). Με την κλωνοποίηση, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό τους και τα δύο ένζυμα βρέθηκαν να καταλύουν τη σύζευξη της GSH στο LTC₄ και άρα τη δημιουργία του LTC₄. Όταν όμως χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το CDNB μόνο για την MGST2 ανιχνεύεται δράση μεταφοράς.

Και τα δύο ένζυμα επιδεικνύουν δράση υπεροξειδάσης στο ότι καταλύουν την GSH-εξαρτώμενη αναγωγή του 5-υδροξυ-υπεροξυ-εικοσατετρανοϊκού οξέος (5-HPETE) σε 5-υδροξυ-εικοσατετρανοϊκό οξύ (5-HETE). Λόγω αυτών των καταλυτικών τους δράσεων, τα δύο αυτά ένζυμα πιθανότατα παίζουν ρόλους τόσο στην αποτοξίνωση από ξενοβιοτικά και στην κυτταρική προστασία απέναντι σε οξειδωτική βλάβη.

1.5.1 Δομή και λειτουργία των μικροσωμικών GSTs

Σε πρώτη ανάλυση, η οικογένεια των MAPEG περιλαμβάνει 13 πρωτεΐνες, 6 θηλαστικών, 4 από φυτά και μύκητες και 3 από τα βακτήρια *E. coli*, *V. Cholera*, *Synecocistis*. Οι 13 αυτές πρωτεΐνες είναι μακρινά ομόλογες με μόνο δύο αμινοξικά κατάλοιπα, την Asn78 και την Arg114, να είναι συντηρημένα σε όλες και το Glu81 να είναι συντηρημένο σε όλες πλην της FLAP (η αρίθμηση έχει γίνει στη βάση της αλληλουχίας της MGST1). Άλλα σχεδόν καθολικά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα είναι η Pro47 και η Arg74 (συντηρημένα σε όλες πλην της FLAP και δυο βακτηριακών) η Pro85 και η Tyr122 (που δεν βρίσκονται συντηρημένα ανάμεσα στις βακτηριακές) (Jacobsson et al., 1999). Για κάποια εξ αυτών έχει υποτεθεί ένας ειδικός ρόλος στην κατάλυση. Η Arg51 στην LTC₄S (αντιστοιχεί στην Arg74 της MGST1) πιστεύεται πως είναι ο πρωτονιοδότης για το άνοιγμα του εποξειδικού δακτυλίου της LTA₄. Στο ίδιο ένζυμο η Tyr93 έχει ταυτοποιηθεί ως το υπεύθυνο κατάλοιπο για το σχηματισμό του θειολικού ανιόντος της γλουταθειόνης και αντιστοιχεί στην Tyr122 του MGST1 που φαίνεται να κάνει την ίδια δουλειά.

Η αρχική ομάδα των 13 MAPEG έχει εν τω μεταξύ επεκταθεί χάρη στις αναλύσεις βιοπληροφορικής σε EST και γενωμικές βάσεις δεδομένων. Συνολικά έχουν βρεθεί 131 διακριτές MAPEG, 52 σε προκαρυώτες και 79 σε ένα ευρύ φάσμα ευκαρυωτικών (Bressel et al., 2005) - ανάμεσά τους 24 έχουν ανιχνευθεί σε φυτά. Και σε αυτή την εκτεταμένη ομάδα MAPEG, κάποια αμινοξικά κατάλοιπα - ανάμεσά τους και αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω - είναι συντηρημένα σε όλα σχεδόν τα μέλη.

Οι μικροσωμικές GSTs αποκλίνουν σημαντικά από τις κυτοσολικές, αφού η αλληλουχική τους ταυτότητα με τις cGSTs είναι μικρότερη από 10% και οι υπομονάδες τους είναι μικρότερες με ένα μέσο μήκος περίπου 150 αμινοξέων. Το πιο σημαντικό είναι ότι η δομή τους είναι εντελώς διαφορετική αφού οι MAPEG που μέχρι τώρα έχουν χαρακτηριστεί έχουν διαμεμβρανικές επικράτειες, τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά τους άκρα προεξέχουν στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ οι περιοχές που θεωρούνται ότι συνδέονται με τα υποστρώματα και τη γλουταθειόνη βρίσκονται σε θηλιές προς το κυτταρόπλασμα. Ενώ αρχικά προβλέπονταν οι διαμεμβρανικές επικράτειες να είναι τρεις, νέες ερμηνείες υδροφοβικών αποτυπωμάτων, ενισχυμένες από τη μελέτη τρισδιάστατων δομικών χαρτών, προτείνουν πλέον ότι οι διαμεμβρανικές επικράτειες είναι πιθανότατα τέσσερις (Bressel et al, 2005).

Ο τρισδιάστατος χάρτης της MGST1 υποδεικνύει πως το ένζυμο αυτό είναι ομοτριμερές. Σε αντίθεση με τις κυτοσολικές, η MGST1 τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού προσδένει ένα υπόστρωμα ανά τριμερές, υποδεικνύοντας ότι τα μονομερή της MGST1 δεν είναι κινητικά ανεξάρτητα, αλλά αλληλεπιδρούν για τη δημιουργία του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

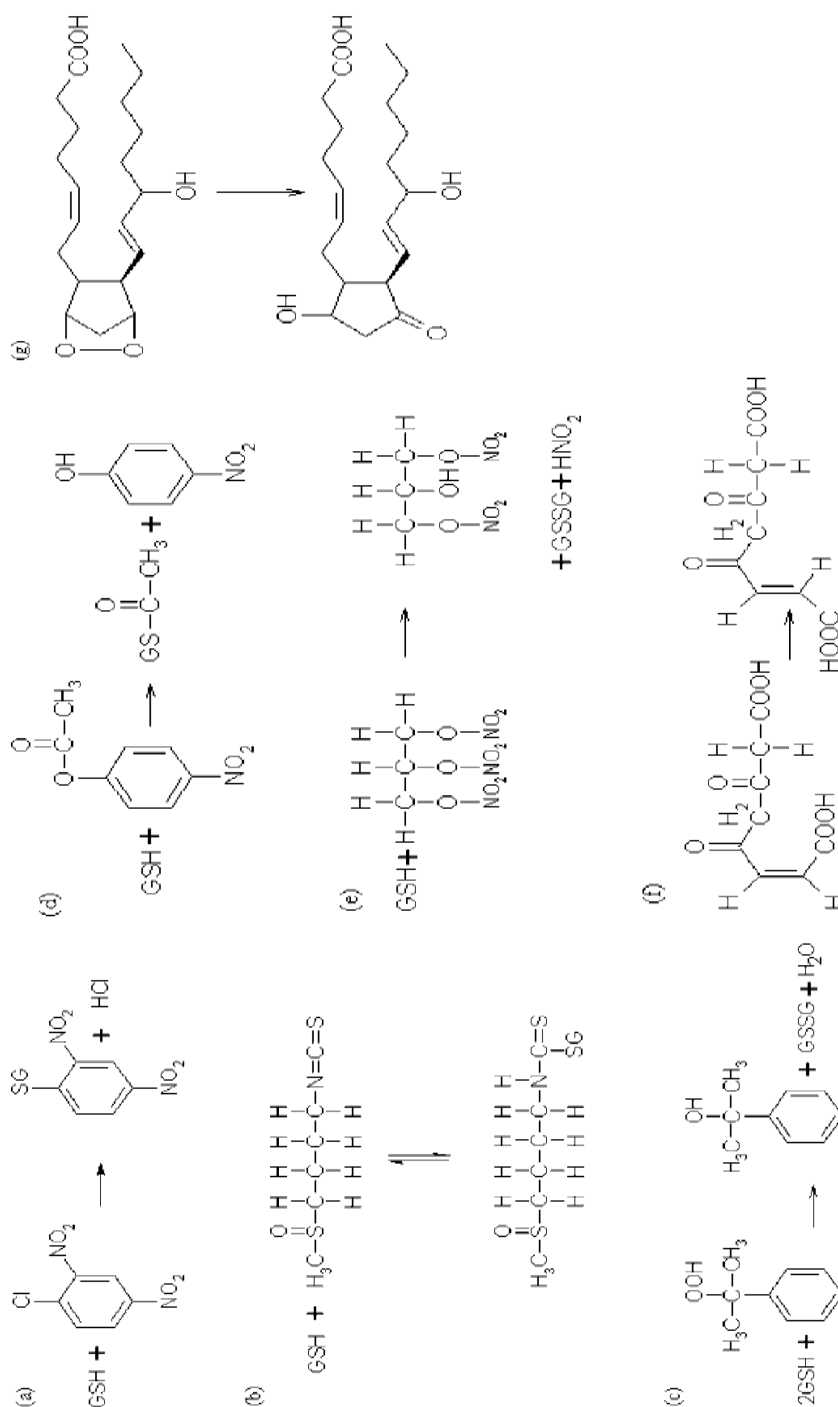
Από απεικονίσεις δομών των LTC₄S και PGES1 φαίνεται πως και τα δύο αυτά ένζυμα είναι ομοτριμερή (Thoren et al., 2003). Μέσω αναλύσεων μεταλλάξεων έλλειψης και αντικατάστασης, ταυτοποιήθηκε μια καρβοξυτελική επικράτεια (αμινοξέα 114-150) απαραίτητη ή και ικανή για τον ολιγομερισμό και την επακόλουθη δράση της LTC₄S, δείχνοντας ότι ο ολιγομερισμός είναι απαραίτητος για τη δομική και καταλυτική σταθερότητα του ενεργού ενζύμου. Αντιθέτως η FLAP μπορεί να υπάρχει και ως τριμερές, διμερές αλλά και μονομερές. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι οι υπομονάδες της FLAP και LTC₄S μπορούν να αλληλεπιδράσουν σχηματίζοντας ετεροδιμερή και ετεροτριμερή, χωρίς όμως να έχει διασαφηνιστεί η σύσταση των ετεροτριμερών (Mandal et al, 2004).

Σε ό, τι αφορά τις τεταρτοταγείς δομές των MGST2 και MGST3, προς το παρόν ελάχιστα είναι γνωστά. Συνοψίζοντας, αρκετές αβεβαιότητες παραμένουν προς το παρόν ως προς τη χωροδιάταξη, τη σύσταση σε υπομονάδες των ολιγομερών και τη μεμβρανική τοπολογία των MAPEGs.

1.6. Μέθοδοι εύρεσης λειτουργίας των GST

Οι λειτουργίες των GST ποικίλλουν αρκετά όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων κλάσεων αλλά και μέσα στα όρια μιας κλάσης. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης συνέβησαν τόσο θεμελιώδεις όσο και πιο λεπτές αλλαγές στην αλληλουχία και τη δομή τους που οδήγησαν στη λειτουργική ποικιλότητα στα πλαίσια της χημείας, της δράσης ή/και της ειδικότητάς τους με το υπόστρωμα.

Γι αυτό στη γκάμα των GSTs που υπάρχουν στη φύση περιλαμβάνονται ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις σύζευξης, αναγωγής και ισομερίωσης καθώς και πρωτεΐνες που δρουν μη ενζυματικά ως προσδέτες-μεταφορείς ή ρυθμιστές μεταγωγής σήματος. Μια ποικιλία προσεγγίσεων, που περιλαμβάνουν την πρόκληση και ανάλυση μεταλλάξεων, βιοχημικές και κινητικές δοκιμασίες με διάφορα υποστρώματα καθώς και κατάρτιση προφίλ έκφρασης και δραστηριότητας σε διαφορετικούς ιστούς και στάδια ανάπτυξης, κάτω από ποικιλία συνθηκών, έχουν συμβάλει στο να διασαφηνιστούν πλατιά λειτουργίες των GSTs (σχήμα 1.4). Με τη βοήθεια των προσεγγίσεων της δομικής βιολογίας έγινε δυνατό να κατανοηθεί, πολλές φορές λεπτομερώς, η αλληλεξάρτηση μεταξύ της πρωτεϊνικής δομής και της λειτουργίας της. Καθορίζοντας το ρόλο συγκεκριμένων αμινοξέων σε κατάλληλες πρωτεϊνικές επικράτειες, οι μελέτες αυτές αποσαφήνισαν τις αρχές που διέπουν τη χημική βάση και την επιλεκτικότητα σε σχέση με το υπόστρωμα για συγκεκριμένα ένζυμα. Γι' αυτό το λόγο οι μελέτες αυτές υπήρξαν θεμελιώδεις για την ανάδειξη της μοριακής βάσης σε ό, τι αφορά τη λειτουργική απόκλιση συγγενικών GSTs, ιδιαίτερα όσων ανήκουν στην ίδια κλάση. Η γνώση αυτή βρίσκει εφαρμογές στο να μας εφοδιάσει με κατευθυντήριες γραμμές για τον χειρισμό της φυσικής λειτουργίας ενζύμων μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης.



Σχήμα 1.4: Παραδείγματα αντιδράσεων που καταλύονται από GSTs παρουσία διαφόρων υποστρωμάτων: a) με CDNB, b) με Sulforaphane, c) με CuOOH, d) με 4-νιτροφαινυλ-οξικό οξύ, e) με Τρινιτρογλυκερίνη, f) με Μαλέυλ-ακετοξικό οξύ, g) με PGH₂. Οι f και g αποτελούν αντιδράσεις ισομερίωσης, οι c και e κλασσικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, η d αποτελεί αντίδραση θειόλυσης και οι a, b αποτελούν αντιδράσεις σύζευξης με GSH. (Hayes et al., 2005)

Πολύ καλό παράδειγμα είναι οι GSTs της A κλάσης των θηλαστικών που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Από τα 5 ανθρώπινα ένζυμα, τα 4 έχουν χαρακτηριστεί ενδελεχώς. Παρόλο που μοιράζονται υψηλή αλληλουχική ομολογία και τη χαρακτηριστική παρουσία μιας καρβοξυτελικής έλικας (α_9) που αναδιπλώνεται προς τα πίσω, προς την αμινοτελική επικράτεια, σε ό, τι αφορά τη σύνδεσή τους με την γλουταθειόνη και ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα, τα 4 χαρακτηρισμένα αυτά ένζυμα δείχνουν αρκετά διακριτές χημικές λειτουργίες και προτιμήσεις υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα η GSTA1-1 δείχνει υψηλή καταλυτική δράση με το CDNB αλλά πολύ μικρότερη ικανότητα με αλκενικά υποστρώματα. Αντίθετα η GSTA4-4 δείχνει ως και 200 φορές πιο υψηλή δραστηριότητα απέναντι σε τέτοια υποστρώματα σε σχέση με την GSTA1-1. Μια σύγκριση ανάμεσα στα δύο ένζυμα υποδεικνύει ότι οι διαφορετικές προδιαγραφές υποστρώματος εξαρτώνται κυρίως από το σχήμα και τα χαρακτηριστικά της θέσης σύνδεσης του υποστρώματος, που με τη σειρά της καθορίζεται από τη τοποθέτηση και τη διάταξη των αμινοξικών καταλοίπων στα γύρω δομικά στοιχεία, δηλαδή τη β_1 - α_1 λούπα, την καρβόξυτελική περιοχή της α_4 έλικας και το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης.

Μέσω μεταλλάξεων και δομικών μελετών (Bjornestedt et al., 1995), ταυτοποιήθηκε ένας περιορισμένος αριθμός αμινοξικών καταλοίπων που βρίσκονται μέσα σε αυτά τα δομικά στοιχεία που είναι κρίσιμα για την υψηλή ενεργότητα της GSTA4-4 απέναντι σε αλκένια. Αυτά είναι η Gly12 (Ala στην GSTA1-1) στη β_1 - α_1 λούπα, Ile107 (Leu), Met108 (Leu) και Phe111 (Val) στο τέλος της α_4 έλικας, Pro208 (Met), Tyr212 (Ser), Val213 (Leu), Val 216 (Ala) και Pro222 (Phe) στη καρβοξυτελική περιοχή. Τα περισσότερα απ' αυτά τα κατάλοιπα διατηρούνται σε όλες τις GSTs που έχουν υψηλή ενεργότητα απέναντι σε αλκένια. Ιδιαίτερα το κατάλοιπο Tyr212 είναι το καταλυτικό κλειδί και βρίσκεται τοποθετημένο ώστε να αλληλεπιδρά με την αλδεϋδομάδα του αλκενικού υποστρώματος και να το πολώνει προκειμένου να του πραγματοποιηθεί πυρηνόφιλη προσθήκη από τη γλουταθειόνη.

Η λειτουργία και η σωστή τοποθέτηση της τυροσίνης αυτής θα εμποδιζόταν από την παρουσία οποιασδήποτε πλευρικής ομάδας στο 12^ο κατάλοιπο, πράγμα το οποίο εξηγεί την απαίτηση να βρίσκεται εκεί η γλυκίνη. Αυτό έχει δειχθεί και από μελέτες μεταλλάξεων στη συγκεκριμένη θέση. Επίσης η παρουσία της προλίνης στη θέση 208 συνεισφέρει στην κάμψη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στη καρβοξυτελική περιοχή για τη σωστή χωρική τοποθέτηση της Tyr212.

Λόγω του μεγάλου αριθμού των μελών της οικογένειας των GSTs, είναι πιθανή η μερική λειτουργική τους επικάλυψη σε ότι αφορά τις λειτουργίες του κάθε οργανισμού όπου εκφράζονται, ειδικά για τις πιο πολυπληθείς τάξεις. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η καταστολή GST γονιδίων -μέσω των λεγόμενων knock out μελετών- δεν είναι πολύ χρήσιμη για τις παραπάνω τάξεις, αλλά έχει δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τις πιο ολιγομελείς κλάσεις GSTs, όπως οι κοινές Σ και Ζ, η Α και Π των θηλαστικών και οι MAPEGs.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων μελετών ήταν αυτές που έλαβαν χώρα κατά τη μελέτη των GSTs Ζ κλάσης. Αυτές οι GSTs εμπλέκονται στο μονοπάτι φαινυλαλανίνης / τυροσίνης, καταλύοντας την ισομερίωση του 4-μηλεϊνυλο-ακετοξικού οξέος σε 4-φουμαρυλο-ακετοξικό, το προτελευταίο βήμα στον καταβολισμό της τυροσίνης. Η δράση ισομεράσης του μηλεϊνυλο-ακετοξικού οξέος (MAAI) που έχει η mGSTZ1 επιβεβαιώθηκε in vivo σε ποντίκια με μηδενική mGSTZ1 τα οποία έχασαν τη δραστηρότητά τους απέναντι στη μηλεϊνυλο-ακετόνη και το χλωρο-φθωρο-οξικό οξύ. Τα ζώα αυτά δεν νοσούν κάτω από κανονικές συνθήκες διαίτας, όμως χάνουν γρήγορα βάρος και τελικά πεθαίνουν όταν τρέφονται με 2% επιπλέον φαινυλαλανίνη (Fernandez-Canon et al., 2002). Καταστολή της παραγωγής (νοκάουτ) mGSTZ1 διεγείρει την αυξορρύθμιση, δηλαδή την υπερέκφραση των GSTs άλλων κλάσεων, των Α, Μ και Φ (Lim et al, 2004). Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα αυτά τα γονίδια GSTs έχουν στους υποκινητές τους στοιχεία (ARE) που ανταποκρίνονται σε αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, και στοιχεία (EprRE) που ανταποκρίνονται σε ηλεκτρονιόφιλα, όπως είναι τα υποστρώματα των GST (Hayes et al., 2005).

1.7. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Λόγω της αρθρωτής δομής τους, τα ένζυμα GST αντιπροσωπεύουν μια πολύ ευπροσάρμοστη πλατφόρμα για την υλοποίηση ενζύμων με νέες βελτιωμένες καταλυτικές ιδιότητες μέσω τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης. Αυτό είναι και το πρώτο πεδίο βιοτεχνολογικής έρευνας στις GSTs που μάλιστα προσελκύει πλατύ ενδιαφέρον, ιδιαίτερα στους τομείς της έρευνας για νέα φάρμακα και βιοκαταλύτες. Ένα δεύτερο πεδίο είναι η δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών. Αυτοί μπορούν να συνεισφέρουν σε πολλούς σκοπούς, ανάμεσα στους οποίους είναι:

- 1) Η κατανόηση γονιδιακών λειτουργιών *in vivo*, όπως το παράδειγμα που περιγράφηκε παραπάνω.
- 2) Η δημιουργία «κυτταρικών εργοστασίων» για την παραγωγή συνθετικών ουσιών με εφαρμογές στην ιατρική και την τεχνολογία.
- 3) Η υλοποίηση οργανισμών με νέα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ως προς αυτό, φυτά και βακτήρια είναι μέχρι τώρα οι κύριοι στόχοι τέτοιων διαδικασιών. Με σχετικά, λοιπόν, εύκολο τρόπο μπορούν να φτιαχτούν διαγονιδιακά φυτά με νέες GSTs που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα απέναντι σε ζιζάνιοκτόνα και ρυπαντές είτε σε σημαντικές σοδειές είτε για την ανάπτυξη ποικιλιών κατάλληλων για φυτοθεραπεία. Στα δε βακτήρια, οι τρέχουσες έρευνες στοχεύουν στη δημιουργία στελεχών ικανών για την αποικοδόμηση τοξικών και καρκινογενών σύνθετων ουσιών.

Οποσδήποτε τα δύο πεδία βιοτεχνολογικής έρευνας που αναφέρθηκαν δεν είναι ανεξάρτητα. Διαγονιδιακοί οργανισμοί μπορούν να δημιουργηθούν με τη χρήση γονιδίων που προήλθαν από μεθόδους κατευθυνόμενης εξέλιξης.

1.7.1. Κατευθυνόμενη εξέλιξη

Ως προς αυτήν υιοθετούνται δύο κύριες στρατηγικές που συνήθως αναφέρονται ως ορθολογική και στοχαστική. Η ορθολογική σχεδίαση συνίσταται στην εισαγωγή συγκεκριμένων αλλαγών αμινοξικών καταλοίπων στη βάση λεπτομερών πληροφοριών από τις πρωτεϊνικές δομές, τις λειτουργίες και τους καταλυτικούς μηχανισμούς. Η γνώση της χωρικής οργάνωσης του ενεργού κέντρου και των ρόλων των διαφορετικών καταλοίπων που εμπλέκονται στην κατάλυση, απαιτείται για την επιλογή των καταλοίπων-στόχων.

1.7.1.a. Ορθολογική στρατηγική

Η πρώτη επιτυχία μέσω αυτής της στρατηγικής ήταν η ανασχεδίαση της GSTA1-1 A κλάσης του ανθρώπου. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, το ένζυμο αυτό είναι πολύ ενεργό με CDNB αλλά δείχνει μικρή δραστηριότητα με αλκεναλικά υποστρώματα, σε αντίθεση με την GSTA4-4. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι κατά 53% όμοια από πλευράς αμινοξικής αλληλουχίας. Προσεκτική σύγκριση των ενεργών τους κέντρων έδειξαν ότι 4 κατάλοιπα (Gly12, Ile107, Met108, Phe111) και η καρβοξυτελική έλικα της GSTA4-4 (κατάλοιπα 208-222) είναι κρίσιμα για την υψηλή ενεργότητα απέναντι στις αλκενάλες. Οι αντίστοιχες περιοχές του GSTA1-1 τροποποιήθηκαν αντιστοίχως και, έτσι, ένα νέο ένζυμο δημιουργήθηκε που αντί της πυρηνόφιλης υποκατάστασης (φυσικός μηχανισμός δράσης της GSTA1-1) πραγματοποιούσε πυρηνόφιλη προσθήκη κατά Michael και είχε λοιπόν υψηλή καταλυτική ικανότητα απέναντι σε αλκενάλες. Η νέα ενζυμική δραστηριότητα υλοποιήθηκε με κόστος την δραστηριότητα σε CDNB, η οποία μειώθηκε περίπου 20 φορές (Nilsson et al., 2000).

Έκτοτε ακολούθησαν πολλές επιτυχημένες ανάλογες μελέτες. Για παράδειγμα η ανθρώπινη GSTA1-1 απέκτησε μία εντελώς νέα καταλυτική ικανότητα υδρόλυσης θειολικού εστέρα (όπως του S-βενζοϋλεστέρα της γλουταθειόνης) με την απλή αντικατάσταση της Ala216 από Ιστιδίνη (Hederos et al., 2004).

Σε μία άλλη έρευνα επετεύχθη η τροποποίηση της H-site της ανθρώπινης GSTA2-2 με την υποκατάσταση πέντε αμινοξέων που οδήγησε στην αλλαγή της δράσης υπεροξειδάσης του ενζύμου σε δράση ισομεράσης στεροειδών (Pettersson et al., 2002). Στη δε GSTF1-1 του καλαμποκιού έγιναν κατορθωτές ουσιώδεις αλλαγές στην εξάρτηση των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου από το pH, μέσω προσεκτικά σχεδιασμένων μεταλλάξεων σε κατάλοιπα της G-site του ενζύμου (Λάμπρου και συν., 2004). Επίσης η μετάλλαξη ενός καταλοίπου-κλειδιού και συγκεκριμένα η υποκατάσταση της Ile118 σε Φαινυλαλανίνη στην H-site του ίδιου ενζύμου, οδήγησε σε τέσσερις φορές βελτιωμένη ειδίκευση του ενζύμου απέναντι στο ζιζανιοκτόνο alachlor (Λάμπρου και συν., 2005).

Ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα της εφαρμογής της ορθολογικής στρατηγικής ήταν η δημιουργία μιας GST ικανής να ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου, δηλαδή με δράση υπεροξειδάσης τυπική των ενζύμων GPXs. Αυτή η ικανότητα εξαρτάται από την παρουσία μιας σεληνοκυστεΐνης στο ενεργό κέντρο των GPXs. Από τη στιγμή που το αμινοξύ αυτό κωδικοποιείται από το κωδικόνιο λήξης UGA, οι προσπάθειες εισαγωγής τέτοιου καταλοίπου στις GSTs μέσω παραδοσιακών τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA υπήρξαν ατελέσφορες. Οι Yu et al. (2005) κατάφεραν να μετατρέψουν την GST κλάσης Δ από τον *L. cuprina* σε ένα σεληνιούχο ένζυμο, υιοθετώντας την εξής στρατηγική. Αφού αντικατέστησαν την Ser7 του ενεργού κέντρου από μία κυστεΐνη, βιοσυνθετικά την υποκατέστησαν με σεληνοκυστεΐνη σε βακτηριακά αυξοτροφικά ως προς την κυστεΐνη συστήματα. Το νέο σεληνο-LcGST1-1 ένζυμο παρουσίασε μία σημαντικά υψηλή ικανότητα στην αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συγκρίσιμη με αυτήν των φυσικών GPXs.

1.7.1.β. Στοχαστική στρατηγική

Από την άλλη οι στοχαστικές αναλύσεις είναι πολύ ενδιαφέρουσες ως προς το ότι στην ουσία αναπαράγουν *in vitro* φυσικούς εξελικτικούς μηχανισμούς. Το σημείο έναρξης των στοχαστικών αναλύσεων είναι συνήθως το ανακάτεμα (shuffling) μονογονικού ή πολυγονικού DNA. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται μεγάλες ανασυνδυασμένες DNA βιβλιοθήκες, οι οποίες κατόπιν εκφράζονται και σκανάζονται για την ενδεχόμενη ύπαρξη νέας και βελτιωμένης ενζυμικής δραστηριότητας. Προφανώς οι δυνατότητες shuffling του DNA και οι γενωματικές αποκλίσεις που μπορούν έτσι να επιτευχθούν είναι σχεδόν ατελείωτες, όμως η διαδικασία σκαναρίσματος και εξέτασης είναι εξαιρετικά επίπονες και χρονοβόρες. Παρά τον περιορισμό αυτό και το ότι υπαισέρεται έντονα ο παράγοντας της τύχης, αρκετά παραδείγματα από τη βιβλιογραφία επισημαίνουν στην επιτυχία μίας στοχαστικής προσέγγισης στην εξέλιξη ενζύμων GSTs με αλλαγμένες λειτουργίες.

Με τέτοιες μεθόδους αποκτήθηκαν ένζυμα με τουλάχιστον νέες, αν όχι καλύτερες, καταλυτικές ικανότητες για τις GSTs M (Hansson et al., 1999) και Θ κλάσης (Broo et al., 2002). Ειδικά η μελέτη για τις T GSTs ανέδειξε τη δύναμη της μεθόδου. Δημιουργήθηκε μία ανασυνδυασμένη DNA βιβλιοθήκη από ανακατεμένες αλληλουχίες γονιδίων ανθρώπινων GSTT1-1 και GSTT2-2 από ποντικό. Λειτουργικός χαρακτηρισμός λιγότερων από 100 τυχαία επιλεγμένων ανασυνδυασμένων κλώνων οδήγησε στην αναγνώριση πάνω από 40 ενζυμικών ποικιλιών με χαρακτηριστικά δραστηριότητας απέναντι σε έξι διαφορετικά ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα που διαφέρουν ουσιωδώς από τα αντίστοιχα γονεϊκά γονίδια των ανθρώπινων GSTT1-1 και GSTT2-2 ποντικού. Αυτά τα πρώτα αποτελέσματα στη συνέχεια βελτιώθηκαν. Όπως και στη φύση, η κατευθυνόμενη εξέλιξη προχωρά μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων μεταλλαξογένεσεων και απομόνωσης των βελτιωμένων μεταλλαγμάτων. Όμως η επιλογή των καλύτερων μεταλλαγμένων γονιδίων από τον ένα κύκλο που με τη σειρά τους θα χρησιμοποιηθούν από έναν επόμενο κύκλο, δεν είναι πάντα προφανής.

Οι Larsson et al. (2004), έδειξαν πως η χρήση στατιστικών εργαλείων μπορεί να βοηθήσει στην «ορθολογική» πλέον επιλογή των μεταλλαγμένων γονιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως γονεϊκά γονίδια για την επόμενη γενιά χιμαιρικών γονιδίων. Εφαρμόζοντας διασταυρούμενες αναλύσεις διαφορετικών κάθε φορά ομάδων από τις παραπάνω 40 αναγνωρισμένες ποικιλίες στη hGSTT1/rGSTT2 βιβλιοθήκη, κατάφεραν να αναγνωρίσουν τους πέντε καλύτερους κλώνους γονιδίων, ώστε να ξεκινήσουν ένα δεύτερο κύκλο shuffling. Από την αντίστοιχη βιβλιοθήκη δεύτερης γενιάς απομονώθηκε ένα νέο ένζυμο Θ κλάσης με 65 φορές βελτιωμένη δράση αλκυλοτρανσφεράσης.

Αυτό είναι ένα παράδειγμα κατευθυνόμενης εξέλιξης, στο οποίο μία βασικά στοχαστική μέθοδος συνδυάζεται με ένα ορθολογικό βήμα. Επίσης έχουν υλοποιηθεί και άλλοι τέτοιοι συνδυασμοί στρατηγικής, κυρίως για τη βελτίωση των GSTs T κλάσης (ZmGSTU1-1 και ZmGSTU2-2) στο καλαμπόκι. Στην περίπτωση αυτή το βέλτιστο χιμαιρικό γονίδιο από επαναλαμβανόμενους κύκλους shuffling αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία και τη δομή του για να βρεθούν οι ακριβείς μεταλλάξεις που έλαβαν χώρα βελτιώνοντας τη λειτουργία του κωδικοποιημένου ενζύμου. Η ουσιώδης μετάλλαξη αφορούσε την υποκατάσταση από λευκίνη της γλουταμίνης στην θέση 115 (Q115L) της καρβοξυτελικής επικράτειας. Το συγκεκριμένο γονίδιο υποβλήθηκε και σε ορθολογικά σχεδιασμένες σημειακές μεταλλάξεις σε αυτή τη θέση με αποτέλεσμα τελικά να αυξηθεί η αποτοξινωτική του δράση απέναντι στο ζιζανιοκτόνο fluorodifen 29 φορές σε σχέση με το ZmGSTU2-2, το δραστικότερο φυσικό GST ένζυμο του καλαμποκιού (Dixon et al.,2003).

1.7.2. Διαγονιδιακοί οργανισμοί ως προς GSTs

Τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά ως προς τη GST ήταν καπνά που υπερέκφραζαν μία ενδογενή GST T κλάσης (*Nt107*) με δράση υπεροξειδάσης. Η υπερέκφραση αυτή είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερες δράσεις τρανσφεράσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GST και GPX αντίστοιχα) ούτως ώστε τα διαγονιδιακά αυτά καπνά να είναι πιο ανθεκτικά στο στρες λόγω υψηλών ή χαμηλών θερμοκρασιών, το στρες αλατότητας και την έκθεσή τους σε ζιζανιοκτόνα (Roxas et al., 1997, 2000). Όμως διαγονιδιακό βαμβάκι με την έκφραση του ίδιου *Nt107* ενζύμου, παρουσίαζε μεν αυξημένη GST/GPX ικανότητα, δεν έδειχνε όμως ανθεκτικότητα σε παράγοντες οξειδωτικού στρες όπως χαμηλή θερμοκρασία, αλατότητα και τα ζιζανιοκτόνα atrazine και imazetrapyr (Light et al., 2005). Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι η είσοδος του ξένου *Nt107* προφανώς διατάραζε το ενδογενές σύστημα προσαρμογής στο στρες του βαμβακιού και γι αυτό δεν παρείχε προστασία απέναντι σε οξειδωτικές βλάβες που επάγονταν από το στρες. Και τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν αυτό που είναι πλατιά γνωστό, ότι δηλαδή η σχεδίαση διαγονιδιακών οργανισμών χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και να λαμβάνονται υπόψη οι ενδογενείς παράγοντες του προς τροποποίηση οργανισμού.

Ένα από τα πιο πολλά υποσχόμενα πεδία στην γενετική τροποποίηση φυτών με διαγονίδια GSTs είναι η υλοποίηση της δυνατότητας αποτοξίνωσης από ξενοβιοτικά, όπως ζιζανιοκτόνα και ρυπαντές. Σε μερικά καλλιεργήσιμα ήδη, όπως το καλαμπόκι και σόγια, οι GSTs έχουν ρόλους κλειδιά στον καθορισμό του καταβολισμού των ζιζανιοκτόνων και του περιορισμού της δράσης τους αποκλειστικά απέναντι στα ζιζάνια χωρίς να εγκυμονείται κίνδυνος για την καλλιέργεια. Όμως για πολλές άλλες καλλιέργειες η χρήση ζιζανιοκτόνων είναι εν πολλοίς περιορισμένη λόγω του ότι οι σοδειές δεν διαθέτουν τις απαραίτητες GSTs για την αποτοξίνωση.

Για παράδειγμα τα καπνά και τα σιτηρά είναι σχετικά ευαίσθητα σε πλατιά χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, όπως τα θειοκαρβαμιδικά και τα χλωρο-ακετο-ανιλνοειδή πχ το alachlor. Η GSTIV καλαμποκιού, ένα ένζυμο GST Φ κλάσης που είναι πολύ δραστικό απέναντι στο alachlor, εκφράστηκε στο καπνό. Τα διαγονιδιακά καπνά έδειξαν σημαντικά αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι στα θειοκαρβαμιδικά και τα χλωρο-ακετο-ανιλνοειδή ζιζανιοκτόνα (Jepson et al., 1997). Επίσης η ZmGSTIV χρησιμοποιήθηκε και για την γενετική τροποποίηση σιτηρών. Και στην περίπτωση αυτή τα διαγονιδιακά φυτά έδειξαν ανθεκτικότητα απέναντι σε αντίστοιχα ξενοβιοτικά και η ανθεκτικότητα των ομόζυγων διαγονιδιακών φυτών συσχετιζόταν με τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (Milligan et al., 2001).

Ακόμα πιο πολλά υποσχόμενες έρευνες επιτεύχθηκαν με την γενετική τροποποίηση του *A. Thaliana* με τη βελτιωμένη T GST του καλαμποκιού που αναφέρθηκε παραπάνω (Dixon et al., 2003). Οι T GSTs προστατεύουν τα φυτά από την απώλεια χρώματος που προκαλούν τα διφαινυλεθερικά ζιζανιοκτόνα, όπως το fluorodifen. Το *A. Thaliana* είναι αρκετά ευαίσθητο στο fluorodifen, ίσως επειδή τα επίπεδα έκφρασης T GSTs είναι μέτρια. Όντως τα διαγονιδιακά φυτά *A. Thaliana* που εκφράζουν το βελτιωμένο ένζυμο του καλαμποκιού είναι εμφανώς πιο ανθεκτικό στο fluorodifen σε σχέση με τα μη τροποποιημένα φυτά ή τα τροποποιημένα με τα άγριου τύπου ένζυμα από καλαμπόκι (Dixon et al., 2003).

Βιοθεραπεία - ή φυτοθεραπεία αν εμπλέκονται τα φυτά και όχι τα βακτήρια – είναι μια γρήγορα αναπτυσσόμενη νέα τεχνολογία που χρησιμοποιεί βακτήρια ή φυτά προκειμένου να απομακρυνθούν ή να αποδομηθούν ρυπαντές από το νερό ή το έδαφος. Ρυπαντές που μπορούν να εξαλειφθούν από την αξιοποίηση GSTs περιλαμβάνουν τοξικά μέταλλα, ραδιενεργά στοιχεία, κατάλοιπα ζιζανιοκτόνων και τοξικές σύνθετες οργανικές ουσίες. Μάλιστα για την καταπολέμηση κάποιων εξ αυτών των ουσιών, κατάλληλα βακτηριακά φυτικά είδη είτε δεν υπάρχουν, είτε επιδεικνύουν χαμηλή ικανότητα αποικοδόμησης. Η «θεραπευτική» τους ικανότητα όμως μπορεί σημαντικά να αυξηθεί με γενετικές μεθόδους.

Τα χλωριωμένα αιθένια (CE) είναι εξαιρετικά τοξικά και πιθανότατα καρκινογενή σύνθετα και περιλαμβάνονται ανάμεσα στους πιο κοινούς εδαφικούς και υδάτινους μολυσματικούς παράγοντες. Η θεραπεία τους από βακτήρια είναι δύσκολη, αφού το πρώτο βήμα για την αποτοξίνωσή τους, η οξειδωσή τους μέσω μονοξυγενάσης, δημιουργεί εποξειδικά ενδιάμεσα που είναι τοξικά για τα ίδια τα βακτήρια. Από τη στιγμή που τα εποξυ-αιθάνια είναι ηλεκτρονιόφιλα, είναι βάσιμο πως θα μπορούσαν να συζευχθούν στη GSH μέσω GSTs προκειμένου να αποτοξινωθούν βιολογικά. Βασιζόμενοι σε αυτή την υπόθεση, οι Rui et al. (2004) δημιούργησαν ένα στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* στο οποίο συνεκφράζονταν μία στοχαστικά βελτιωμένη μονοξυγενάση του τολουενίου από την *Burkholderia cepacia* με αυξημένη ικανότητα αποικοδόμησης του cis-διχλωρο-ακετυλενίου (cis-DCE), μία καινούρια GST από το *Rhodococcus* καθώς και μία μεταλλαγμένη συνθετάση της γλουταθειόνης της *E. coli* που αυξάνει τα επίπεδα της GSH στο γενετικά τροποποιημένο βακτήριο. Το ανασυνδυασμένο βακτηριακό αυτό στέλεχος εξέφραζε ταυτόχρονα 8 γονίδια, 5 φυσιολογικά και τα 3 παραπάνω μέσω της τοποθέτησης των τελευταίων σε κοινό οπερόνιο. Έτσι δημιουργήθηκε ένα τεχνητό μεταβολικό μονοπάτι μέσω του οποίου τα ανασυνδυασμένα βακτήρια *E. coli* μπορούσαν να αποδομήσουν επαρκώς το cis-DCE, χωρίς να βλάπτονται από τα εποξυ-αιθάνια, αφού αυτά μπορούσαν να ανάγονται άμεσα από την GST του *Rhodococcus*. Αυτός ο ορθολογικός συνδυασμός καταβολικών σταδίων καταλυόμενων από ένζυμα διαφορετικών οργανισμών, είναι ένα έξοχο παράδειγμα των δυνατοτήτων της μεταβολικής μηχανικής στη βιοθεραπεία περιβαλλοντικών ρυπαντών (Rugh et al., 1998).

Τέλος σκόπιμο είναι να αναφερθεί το γενετικά τροποποιημένο καπνό με το γονίδιο GSTF1 από καλαμπόκι. Το διαγονιδιακό αυτό φυτό έδειχνε σημαντικά υψηλότερη αντοχή στο alachlor σε σχέση με τα άγριου τύπου φυτά. Τα διαγονιδιακά αυτά φυτά πιθανότατα μπορούν να αξιοποιηθούν στη φυτοθεραπεία καλλιεργήσιμων εκτάσεων βεβαρυσμένων με κατάλοιπα ζιζανιοκτόνων που είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες καλλιέργειες (Καραβαγγέλης και συν., 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ

2.1. ΥΛΙΚΑ

Ο πλασμιδιακός φορέας **pCR[®]T7/CT-TOPO[®]** που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των γονιδίων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από το βακτήριο *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCRI1043 καθώς και τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* TOP10F' στα οποία πραγματοποιήθηκε η επιλογή, ο πολλαπλασιασμός και η διατήρηση των μετασχηματισμένων πλασμιδίων προήλθαν από το pCR[®]T7/CT-TOPO[®]TA Expression Kit της εταιρείας Invitrogen (USA). Τα κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των GST γονιδίων αγοράστηκαν από την εταιρεία Novogene (USA).

Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG), το αντιβιοτικό αμικικιλίνη καθώς και η αгарόζη αγοράστηκαν από την εταιρεία Genaxis (UK), η χρωστική Coomassie Blue (G-250) από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη και το άγαρ από την ισπανική εταιρεία Scharlau (Ισπανία). Το κιτ απομόνωσης DNA από *E. carotovora* ήταν από την Sigma-Aldrich (USA). Οι Extent και η Go-Taq DNA πολυμεράσες και τα dNTPs αγοράστηκαν από την εταιρεία Promega.

Το **QIAquick[™] Mini Prep Kit** που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA αγοράστηκε από την γερμανική εταιρεία Qiagen.

Αμικικιλίνη

Ζυγίζεται στο ζυγό σκόνη αμικικιλίνης και φτιάχνεται πυκνό διάλυμα αμικικιλίνης 100 mg/ml. Διατηρείται στο ψυγείο. Απ' αυτήν θα χρησιμοποιώ 1 μl για κάθε ml θρεπτικού υλικού (δηλαδή για τελική συγκέντρωση Amp 100 μg/ml καλλιέργειας)

LB υγρό θρεπτικό μέσο

0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) πεπτόνη. Ακολουθεί αποστείρωση. Για **στερεό θρεπτικό μέσο** προστίθεται 1,5 % (w/v) άγαρ αμέσως μετά την αποστείρωση.

IPTG

24 mg/ml σε ddH₂O. Διατηρείται στους -20°C.

Διάλυμα TB για την προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

Τελικές συγκεντρώσεις συστατικών: 10mM MES, 55mM MgCl₂·6H₂O, 15mM CaCl₂·2H₂O και 250mM KCl σε ddH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,7 με προσθήκη πυκνού KOH. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C.

Διάλυμα λύσης κυττάρων

Αναμιγνύονται 0,1M KH₂PO₄ με 1mM β-μερκαπτοαιθανόλης (MeSH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.

50X Ρυθμιστικό Διάλυμα TAE

Το 1 Lt περιέχει 24,2 gr Tris-base, 100ml 0,5M EDTA pH 8,0 και 57 ml CH₃COOH.

Βρωμιούχο Αιθίδιο

5 mg/ml σε ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκουρόχρωμο δοχείο στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

Αναμιγνύονται 10 ml γλυκερόλης 50 % (w/v), 200 μl EDTA από 0,5M pH 8,0 και 25 mg της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.

Lysis Buffer για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για 12 απομονώσεις στα οποία διαμοιράζεται βακτηριακή προκαλλιέργεια, χρησιμοποιούνται: 150 μl 0,5M Tris HCl pH=8, 60 μl 0,5M EDTA pH=8, 75 μl 2M γλυκόζη. Προστίθενται 3 ml ddH₂O και πραγματοποιείται ανάδευση.

Διάλυμα NaOH / SDS για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για 12 απομονώσεις στα οποία διαμοιράζεται βακτηριακή προκαλλιέργεια, χρησιμοποιούνται: 114 μ l 10M NaOH, 568 μ l 10% SDS και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 5 ml. Πραγματοποιείται ανάδευση. Επειδή το SDS είναι δυσδιάλυτο, το διάλυμα ζεσταίνεται ελαφρά μέχρι να γίνει διαυγές.

Διάλυμα οξικού αμμωνίου (AmAc) για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για 12 απομονώσεις, στα οποία διαμοιράζεται βακτηριακή προκαλλιέργεια, χρησιμοποιούνται: 45 μ l 10 mg/ml ενζύμου RNAase A, που φυλάσσεται στους -20°C και 4,5 ml 7,5M AmAc pH=7,8.

2.2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΟΡΓΑΝΑ

Οι προσδιορισμοί της ενζυμικής δραστηριότητας των GST ενζύμων έγιναν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους, μοντέλο U-2000 της ιαπωνικής εταιρείας Hitachi με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm. Η υποδοχή της κυψελίδας του οργάνου είναι θερμορυθμιζόμενη μέσω υδραυλικού συστήματος που τροφοδοτείται από υδατόλουτρο.

Για τις διάφορες φυγοκεντρήσεις που περιγράφονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Heraeus SEPATECH Contrifuge 17RS, Varifuge 20RS και η φυγόκεντρος Heraeus Biofuge primo.

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

Οι λύσεις των κυττάρων έγιναν με τη χρησιμοποίηση υπερήχων από το όργανο Sonics & Materials Inc. Vibra Cell.

Οι ηλεκτροφορήσεις του DNA σε πήκτη αγαρόζης έγιναν στη συσκευή HE 99X της αμερικάνικης εταιρείας Hoefler.

Οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμίδης έγιναν σε ψυχόμενη κάθετη συσκευή SE 600 της Hoefler.

Το τροφοδοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο SP 500 x T με παρεχόμενα κανάλια 500 Volt και 400 mA επίσης της εταιρείας Hoefler.

Για τον επιχειρημένο καθαρισμό των ενζύμων GST χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης σεφαρόζης με βραχίονα 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα συνδεδεμένο με γλουταθειόνη. Η στήλη παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

Για την διαδικασία PCR (Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής PE Applied Biosystems Gene Amp[®] 9700. Η συγκεκριμένη συσκευή διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι και δεν χρειάζεται προσθήκη λαδιού για την τέλεση της αντίδρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Κατασκευή πηκτώματος αгарόζης για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA.

Αραίωση διαλύματος 50X TAE 50 φορές σε αποστειρωμένο νερό σε τελικό όγκο 50 ml. Διάλυση υπό θέρμανση φούρνο μικροκυμάτων 0,5 g αγαρόζης στο παραπάνω διάλυμα μέσα σε κωνική φιάλη. Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει σε θερμοκρασία περίπου 50°C. Κατόπιν προστίθεται 4,5λ βρωμιούχο αιθίδιο. Το διάλυμα αναδεύεται ώστε το βρωμιούχο αιθίδιο να διαλυθεί εντελώς. Το διάλυμα κατόπιν μεταγγίζεται στο ειδικό καλούπι, ώστε να πήξει.

3.2. Πρωτόκολλο της PCR.

Τα αντιδραστήρια που τελικά τελεσφόρησαν στην παρούσα εργασία είναι τα παρακάτω:

H ₂ O	33,3λ
Buffer Taq	10λ
MgCl ₂	3λ
dNTPs (0,2M)	1λ
Εκκινητής FGC	0,6λ
Εκκινητής RGC	0,6λ
μήτρα	1λ

Η μήτρα χρωμοσωμικού DNA που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί το αραιωμένο 1/10 πρώτο διάλυμα έκλουσης του βήματος 10 απ' την διαδικασία απομόνωσης γενωματικού DNA από το βακτήριο *Erwinia carotovora* με τη χρησιμοποίηση του ειδικού kit της Sigma. Περιγράφεται παρακάτω.

Οι δύο εκκινητές που σχεδιάσαμε και χρησιμοποιήσαμε για την απομόνωση και αντιγραφή κάθε γονίδιου και αποτελούνται από 25 νουκλεοτίδια έκαστος:

Ο εκκινητής FGC είναι συμπληρωματικός στο 3' άκρο της αντικωδικής (μη κωδικής) αλυσίδας του γονιδίου και κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR θα οδηγήσει στη σύνθεση της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου από την DNA-πολυμεράση με καλούπι την αντικωδική. Ο εκκινητής RGC έχει ίδια αλληλουχία με τις 25 πρώτες βάσεις (του 5' άκρου) της αντικωδικής αλυσίδας του γονιδίου και είναι άρα συμπληρωματικός με το 3' άκρο της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου. Αυτός κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR θα οδηγήσει στη σύνθεση της αντικωδικής αλυσίδας του γονιδίου από την DNA-πολυμεράση με καλούπι την κωδική.

Οι ποσότητες των εκκινητών που αναγράφονται στο πρωτόκολλο βρέθηκαν ώστε να υπάρχουν για κάθε αντίδραση PCR ~2 pmoles από τον καθένα. Το διάλυμα που χρησιμοποιώ για τον κάθε εκκινητή είναι 1/10 αραιωμένο σε σχέση με την συγκέντρωση του κατασκευαστή (42 pmol/μl για τον FGC και 40 pmol/μl για τον RGC).

Η Extent και η Go-Taq DNA πολυμεράσες λειτουργούν στους 72°C και είναι γρηγορότερες της Taq πολυμεράσης. Τελικά χρησιμοποιήθηκε η Go-Taq DNA πολυμεράση. Τελικός όγκος των συστατικών της αντίδρασης είναι τα 50λ, που τοποθετούνται σε φιαλίδια erpendorf χωρητικότητας 0,5 ml κατάλληλα για αντιδράσεις PCR. Ακολούθως αναμειγνύονται καλά σε vortex και φυγοκεντρώνονται για λίγο (μερικά δευτερόλεπτα) προκειμένου να συγκεντρωθούν στον πυθμένα του φιαλιδίου όπου μπορούν να αντιδράσουν αποδοτικότερα στις γρήγορες εναλλαγές της θερμοκρασίας κατά το χρονικό διάστημα που παραμένουν στον θερμοκυκλοποιητή.

Ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίζεται με το κατάλληλο πρόγραμμα που στη παρούσα εργασία καθορίστηκε να περιλαμβάνει 30 διαδοχικούς επαναλαμβανόμενους κύκλους, στον καθένα από τους οποίους η θερμοκρασία αρχικά ανεβαίνει στους 96°C για 2,5 λεπτά (σε αυτή τη φάση αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA), κατόπιν η θερμοκρασία κατεβαίνει για 2 λεπτά στους 43°C δηλαδή

σε θερμοκρασία επανυβριδοποίησης κατώτερη των θερμοκρασιών υβριδοποίησης (T_m) των δύο εκκινητών (μας ενημερώνει ο κατασκευαστής σχετικά) προκειμένου αυτοί να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, ακολούθως η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72°C για 2 λεπτά όπου δρα η Go-Taq DNA-πολυμεράση επιμηκώνοντας τους εκκινητές. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 72°C για 10 λεπτά. Η αρχική αποδιάταξη όπου προστέθηκε και η DNA-πολυμεράση έγινε στους 72°C για 3 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, τα προϊόντα αναλύονται σε πήκτη αγαρόζης.

Για την επιλογή του ακριβούς προγράμματος χρειάζεται να ληφθούν υπόψη μια σειρά παράμετροι, να γίνουν δοκιμές και να αξιολογηθούν διάφορα πιθανά λάθη με τη χρήση διαφόρων ελεγκτικών δειγμάτων.

3.3. Ανάπτυξη της σε *E. carotovora subsp. atroseptica*.

Αρχικά οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για δύο ημέρες σε τρυβλία με θρεπτικά υλικά MSM και LB. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού Minimal Salts Media (MSM) είναι η εξής : 6 g/L Na_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L NaCl , pH 7.4, 100 g/L NH_4Cl , pH 7.4, 1.0 M MgSO_4 , 20% (w/v) D-γλυκόζη, 0.5 M CaCl_2 . Στη συνέχεια όμως για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε μόνο LB ως θρεπτικό υλικό. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε φιάλες Erlenmeyer με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB περιεκτικότητας 1% (w/v) πεπτόνη, 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0,5%(w/v) NaCl .

Παρακάτω ακολουθεί η περιγραφή της διαδικασίας: σε 250 ml του θρεπτικού υλικού LB εμβολιάστηκαν 40 μl βακτηριακής καλλιέργειας. Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση σε περιστροφικό επωαστήριο (210rpm) στους 30°C για 18h περίπου. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 20 min στους 4°C .

3.4. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωματικού DNA

Χρησιμοποιήθηκε το kit από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

1) Προθερμαίνουμε ένα υδατόλουτρο ή heating block στους 55°C και για θετικά και για αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Προθερμαίνουμε άλλο ένα υδατόλουτρο ή heating block στους 37°C μόνο για θετικά κατά Gram βακτήρια. Βέβαια η *Erwinia carotovora* ανήκει στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, γι αυτό και δεν πραγματοποιήθηκε το τελευταίο βήμα.

2) Εξετάζουμε τα αντιδραστήρια που προμηθεύονται με το kit για τυχούσες καθιζήσεις. Αν υπάρχουν, θερμαίνουμε το αντιδραστήριο που τις παρουσιάζει στους 55 - 65°C μέχρι να επαναδιαλυθεί το ίζημα. Επαναφέρουμε σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

3) Για το διάλυμα Dilute Wash Solution Concentrate: Διαλύουμε το συμπυκνωμένο διάλυμα (βρίσκεται διαμοιρασμένο σε 10 minipreps) με 10 ml 95-96% αιθανόλη. Μετά από κάθε χρήση κλείνουμε ερμητικά το καπάκι του αραιωμένου Wash Solution για να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης.

4) Για το διάλυμα Reconstitute Proteinase K: διαλύουμε το παρεχόμενο ένζυμο σε σκόνη σε ένα falcon για την παρασκευή stock διαλύματος πρωτεϊνάσης K 20mg/ml. Το διάλυμα αυτό μπορεί να αποθηκευτεί για μερικές μέρες στους 2-8°C. Για πιο μακροπρόθεσμη αποθήκευση, το διάλυμα πρέπει να αποθηκεύεται σε δείγματα στους -20°C.

Εφόσον τα παραπάνω έχουν φτιαχτεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κάθε επόμενη απομόνωση χρωμοσωμικού DNA.

Κύρια διαδικασία

1) Φυγοκεντρούμε στις 10400 – 13150 rpm για 2 min 1,5 ml από μια καλλιέργεια βακτηρίων που αναπτύχθηκε για 12 - 18 ώρες. Απομακρύνουμε εντελώς το θρεπτικό μέσο (υπερκεείμενο) και κρατάμε το ίζημα των κυττάρων.

2) Διαλύουμε το ίζημα σε 180 λ του Lyse-T (B6678), που παρέχεται μαζί με το kit. Εάν μας ενδιαφέρει να απομονώσουμε DNA απαλλαγμένο από RNA, τότε προσθέτουμε 20 λ RNAase A Solution (R6148) - που παρέχεται μαζί με το kit - αναδεύουμε σε vortex και επωάζουμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παρούσα εργασία αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε.

3) Προσθέτουμε στο δείγμα 20 λ του διαλύματος της πρωτεΐνάσης K που παρασκευάσαμε παραπάνω. Αναδεύουμε σε vortex και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 55°C.

4) Κατόπιν προσθέτουμε 200 λ του Lyse (B8803), αναδεύουμε σε vortex για 15 δευτερόλεπτα και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 55°C. Ένα αποτελεσματικό ανακάτεμα είναι σημαντικό για αποτελεσματική λύση.

5) Για να ετοιμάσουμε την κολόνα διαχωρισμού που θα χρησιμοποιήσουμε στη διαδικασία: Προσθέτουμε 500 λ του ειδικού διαλύματος προετοιμασίας της κολόνας σε κάθε προσυναρμολογημένη GenElute Miniprep κολόνα πρόσδεσης που την έχουμε τοποθετήσει σε ένα σωλήνα συλλογής των 2 ml. Φυγοκεντρούμε στις 11400 rpm για 1 λεπτό. Απομακρύνουμε το έκλυμα. Το διάλυμα προετοιμασίας της κολόνας μεγιστοποιεί την πρόσδεση του DNA στην κολόνα. Το διάλυμα προετοιμασίας, η κολόνα πρόσδεσης και οι σωλήνες συλλογής των 2 ml παρέχονται στο kit.

6) Προσθέτουμε 200 λ αιθανόλης (95 – 100%) στο επωασμένο λελυμένο δείγμα από το βήμα 4 και αναδεύουμε σε vortex για 5-10 sec. Το ομογενές ανακάτεμα είναι σημαντικό.

7) Μεταφέρουμε προσεκτικά το περιεχόμενο του βήματος 6 στην κολόνα πρόσδεσης, όπως την αφήσαμε από το βήμα 5. Έναντι του κινδύνου σπασίματος του DNA κατά τη μεταφορά αυτή, χρησιμοποιούμε μεγάλη πιπέτα. Φυγοκεντρούμε στις ≥ 8360 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το σωλήνα συλλογής μαζί με το έκλουμα και τοποθετούμε την κολόνα σε ένα νέο σωλήνα συλλογής των 2 ml.

8) Προσθέτουμε 500 λ του Wash Solution 1 (W0263) – παρέχεται στο kit – στην κολόνα και φυγοκεντρούμε στις 8360 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το σωλήνα συλλογής μαζί με το έκλουμα και τοποθετούμε την κολόνα σε ένα νέο σωλήνα.

9) Προσθέτουμε 500 λ του Wash solution με την αιθανόλη που παρασκευάσαμε προκαταρκτικά και φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα ώστε να στεγνώσει η κολόνα. Πριν εκλούσουμε το DNA, η κολόνα δεν πρέπει να έχει αιθανόλη. Γι' αυτό επαναφυγοκεντρούμε ένα επιπλέον λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα (αν βλέπουμε εναπομένονσα αιθανόλη στην κολόνα), αφού αδειάσουμε το σωλήνα συλλογής και του ξαναβάλουμε την κολόνα. Τέλος πετάμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε την κολόνα σε ένα νέο σωλήνα συλλογής.

10) Βάζουμε 200 λ του διαλύματος έκλυσης Elution Solution (B6803) – παρέχεται στο kit – κατευθείαν στο κέντρο της κολόνας. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις ≥ 8360 rpm ώστε να εκλουσθεί το DNA. Για να αυξήσουμε την ικανότητα έκλυσης, επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού προσθέσουμε το Elution Solution και κατόπιν φυγοκεντρούμε.

Συλλέχθηκε επίσης και μία δεύτερη έκλυση – με την επανάληψη του βήματος 10 σε ένα δεύτερο σωλήνα συλλογής. Τα κλάσματα έκλυσης περιέχουν καθαρό γενωμικό DNA.

Για βραχυπρόθεσμη αποθήκευση συνιστώνται οι 2 – 8°C, ενώ η μακροπρόθεσμη πρέπει να γίνει στους -20°C. Να αποφεύγεται εναλλασσόμενο πάγωμα και ξεπάγωμα που προκαλεί σπάσιμο των κλώνων του DNA. Το Elution Solution βοηθά στη σταθεροποίηση του DNA στις θερμοκρασίες αυτές.

3.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (αλκαλική λύση)

Η προκαλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων διαμοιράζεται σε eppendorfs (στη παρούσα εργασία διαμοιράζεται σε 12 eppendorfs) των 1,5 ml. Κάθε eppendorf φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο πετιέται και κάθε eppendorf αφήνεται αντεστραμμένο να στεγνώσει για λίγα λεπτά.

Προστίθεται σε κάθε eppendorf 200 λ Lysis Buffer και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε vortex μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Κατόπιν με γρήγορες κινήσεις προστίθενται 400 λ NaOH / SDS στα τοιχώματα κάθε eppendorf και τα δείγματα αναδεύονται μέσω τεσσάρων αναστροφών της βάσης (στατό) στην οποία βρίσκονται. Κατόπιν τοποθετούνται σε πάγο για πέντε λεπτά. Λίγο πριν περάσουν 4,5 λεπτά, στο ίδιο αριθμό άλλων eppendorfs με αυτά της προκαλλιέργειας, προστίθενται στο καθένα 45 λ σε 4,5 ml AmAc.

Αμέσως μόλις περάσουν τα 5 λεπτά, μεταφέρονται από 300 λ από κάθε eppendorf σε κάθε eppendorf προκαλλιέργειας. Τα δείγματα αναδεύονται με γρήγορες και ήρεμες κινήσεις αναστροφής τους 5 φορές και αφήνονται στο πάγο για άλλα 10 λεπτά.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm για 15 λεπτά. Τα υπερκείμενα παραλαμβάνονται και τοποθετούνται σε νέα eppendorfs, όπου συμπληρώνουμε με 700 λ ισοπροπανόλης στο καθένα. Αναδεύουμε και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά.

Κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 15 λεπτά. Δημιουργείται ίζημα που δεν είναι ευδιάκριτο. Το υποκείμενο πετιέται χωρίς πιπέτα ώστε να μην συμπαρασυρθεί και το ίζημα. Στο ίζημα σε κάθε erpendorf προστίθεται 1 ml 70% αιθανόλης και ακολουθεί σύντομη ανάδευση σε vortex. Κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 8-10 λεπτά.

Το υπερκείμενο αποβάλλεται (χωρίς πιπέτα) και το κάθε erpendorf αφήνεται αντεστραμμένο να στεγνώσει για περίπου μία ώρα μέχρι να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη. Προσθέτουμε 30 λ αποσταγμένο νερό και αναδεύουμε καλά σε vortex.

Τέλος ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 3 λεπτά και το υπερκείμενο, που περιέχει σε σχετικά καθαρή μορφή το πλασμίδιο, τοποθετείται σε νέα erpendorfs και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα.

3.6. Λύση κυττάρων και παραλαβή τον ενζυμικού εκχυλίσματος.

Κύτταρα που έχουν παραλειφθεί από καλλιέργεια αιωρούνται, μετά από την ισχυρή τους ανάδευση σε vortex, σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,5 37°C.

Για τη λύση των κυττάρων γίνεται εφαρμογή υπερήχων για 15 δευτερόλεπτα εντός του διαλύματος με την ειδική συσκευή υπερήχων στο 20% της ισχύος της. Ακολουθεί ηρεμία για περίπου 45 δεύτερα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε παγόλουτρο (2-4°C) για να αποφευχθεί υπερθέρμανση. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5-10 min στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία.

3.7. 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 απορρόφηση στα 340nm, οφειλόμενη στο σχηματισμό του συμπλόκου GS-CDNB.



Στις κυψελίδες εισάγεται μίγμα επώασης συνολικού όγκου 1ml και αποτελείται από: 90 mM διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,5), 2,5 mM GSH (γλουταθειόνη), 1,0 mM CDNB και ένζυμο (GST ως 0.02 units*). Στη παρούσα εργασία στην κάθε κυψελίδα προσθέτουμε 923 λ διαλύματος φωσφορικού καλίου, 33 λ CDNB, 33 λ GSH και 10 λ από το υπερκείμενο που παραλείφθηκε μετά τη λύση των κυττάρων, μέσω της διαδικασίας που περιγράφεται αμέσων πριν, και περιέχει το ένζυμο.

Η διαδικασία διαρκεί 2 min και το φωτοφασματόμετρο παίρνει μέτρηση κάθε 6 δευτερόλεπτα. Σε κάθε μέτρηση υπολογίζει και την ταχύτητα κατάλυσης του ενζύμου σε D/min. Υπολογίζουμε το μέσο όρο της ταχύτητας κατάλυσης. Για να προσδιορίσουμε ποσοτικά το σύμπλοκο GS-CDNB χρησιμοποιήσαμε ως συντελεστή μοριακής απόσβεσης την τιμή 9,6 1/mmol x cm και την σχέση:

$$\text{U/ml} = (\text{D/min} * \text{Vol}) / (\text{Vενζ} * 9,6 * \text{αραίωση ενζύμου}) = \text{D/min} * 10,42$$

Όταν γίνεται αναφορά σε ενζυμική μονάδα GST εννοείται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή ενός μmol CDNB σε προϊόν ανά min στους 37°C.

3.8. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες υπό την επίδραση όξινου περιβάλλοντος. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm. Η αξιοπιστία της μεθόδου περιορίζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα που η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ των 0,04 mg/ml και 0,20 mg/ml.

Συγκεκριμένα η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά 100mg της χρωστικής διαλύονται σε 100ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50%v/v). Επίσης στο διάλυμα προστίθενται 100ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85%v/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 να προσδιορίσουμε την πρωτεΐνη αραιώνουμε το αντιδραστήριο με νερό σε αναλογία 1/4. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστου δείγματος αναμιγνύουμε 950 μl του αντιδραστηρίου Bradford με 50 μl πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης (2-10 μg) και αφήνουμε για επώαση στους 25°C για 25 min. Στη συνέχεια λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm χρησιμοποιώντας διάλυμα αναφοράς που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός της πρωτεΐνης.

Με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης (Επιπλέον από την καμπύλη υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης). Για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιούνται ως πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10 μg) αλβουμίνης από ορό μόσχου (fraction V).

3.9. Διαπίδυση – Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

Το ενζυμικό εκχύλισμα πριν τον καθαρισμό υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι 2000 όγκων ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M KH_2PO_4 , pH 7. Χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12 kD (Sigma-Aldrich). Η διαδικασία διαρκεί 18-24h και πραγματοποιείται στους 4°C και έχει ως στόχο την απομάκρυνση όλων των ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (<12 kDa).

Οι μεμβράνες διαπίδυσης που χρησιμοποιούνται αγοράζονται σε ρολό από τη Sigma-Aldrich. Για την προετοιμασία τους κόβονται με ψαλίδι κάθε περίπου 1m και εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2 lt με 10 gr EDTA και 17 gr NaHCO_3 . Εκεί βράζονται για 2 ώρες. Μετά το πέρας του βρασίματος, ξεπλένεται καλά κάθε κομμάτι μεμβράνης με dH_2O . Διατηρείται στους 4°C μέσα σε υδατικό διάλυμα 20% (v/v) αιθανόλη.

3.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου

3.10.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS)

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων, που αποτελούνται 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 επιστοιβαξης : Tris/HCl (0,5M), pH 6,8.
- Δ) Διάλυμα ακρυλαμίδιου: ακρυλαμίδιο (30g, 0,42mol) και N, N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (0,8g, 5,2 mmol) διαλυμένα σε 100ml νερού.

Ε) Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων: Tris/HCl (0,125M) pH 6,8, SDS (4% w/v), γλυκερόλη (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, προστίθενται 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 (1h, 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 (~62μl), αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (625μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450μl) και στη συνέχεια απαραιώνεται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 min. Μετά την απαραιώση προστίθεται 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).

3.10.2. Προετοιμασία των δειγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.

Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα συμπυκνώνονται με λυοφιλίωση. Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος (~35μg) διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (~10μl) όπου θερμαίνεται στους 75-100°C. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ως μάρτυρας η χρωστική μπλε της βρωμοκρεζόλης (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.

3.10.3. Βαφή Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από ηλεκτροφόρηση για την βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών σε συνθήκες μετουσίωσης. 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).

3.11. Παρασκευή στήλης συγγένειας με ακινητοποιημένη GSH με βραχίονα 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα.

Η Sepharose CL-6B είναι ένας χρωματογραφικός φορέας με εξαιρετικές ιδιότητες απορροής και υψηλή χωρητικότητα για πρωτεΐνες. Ο βραχίονας προβλέπεται να συγκρατεί στο ένα του άκρο την γλουταθειόνη (GSH, που είναι υπόστρωμα της GST). Η στήλη αυτή θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υπό προϋποθέσεις απομόνωση ενζύμων GST.

Σφαιρίδια Sepharose CL-6B τοποθετούνται σε ηθμό και διηθούνται με τη βοήθεια αντλίας κενού. Κατόπιν ξεπλένονται με 120 ml dd H₂O. Ακολούθως ζυγίζονται περίπου 10 g Sepharose CL 6B.

Προσθέτονται 10 ml 0.6M NaOH, ώστε να ιονιστούν οι υδρόφιλες ομάδες της Sepharose CL 6B και έτσι αυτή να ενεργοποιηθεί. Αναδεύονται κυκλικά (16 rpm) για περίπου 2,5 ώρες. Κατόπιν προστίθενται 2 ml 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα (που θα παίξει το ρόλο βραχίονα). Στις ίδιες συνθήκες αναδεύεται κυκλικά για 2 ώρες. Το αιώρημα διηθείται και ξεπλένεται με 150 ml ddH₂O σε αντλία κενού.

Ζυγίζονται 200 mg από την στεγνή Sepharose CL 6B με τον βραχίονα σε erendorf, που θα χρησιμοποιηθούν σε ειδικό test για την διαπίστωση της ικανότητας πρόσδεσης του γλουταθείου. Διαλύονται 0,614 gr γλουταθείου σε 15 ml ρυθμιστικού φωσφορικών 1M, pH=8. Κατόπιν αναμιγνύεται το διάλυμα αυτό με τον στεγνό προσροφητή που παρασκευάστηκε με την παραπάνω διαδικασία. Η ποσότητα του γλουταθείου που επιλέγεται πρέπει να είναι τουλάχιστον η εικοσαπλάσια σε απόλυτο αριθμό μmoles από τα γραμμάρια της Sepharose CL 6B, αφού τόσο υπαγορεύει η ικανότητα υποκατάστασής του. Αφήνεται υπό κυκλική ανάδευση στις ίδιες συνθήκες για τουλάχιστον 42 ώρες.

Ζύγιση 200 µg του προσροφητή σε erendorff, δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό του έλεγχο.

Ακολουθεί διήθηση και ξέπλυμα με 150 ml ddH₂O. Ο έτοιμος, στεγνός προσροφητής τοποθετείται σε διάλυμα 20% αιθανόλη, ώστε το διάλυμα να υπερκαλύπτει τον προσροφητή σε ηρεμία. Φυλάσσεται στους 4°C.

Ακολουθεί ποιοτικός έλεγχος του προσροφητή. Αυτός γίνεται ως εξής: Σε κάθε ένα από τα δύο erendorff με τον προσροφητή από τα δύο διαφορετικά στάδια της παρασκευής του (πριν και μετά την προσθήκη γλουταθείου). Προστίθενται τα εξής: διάλυμα 2 mg Na₂CO₃ σε 100 µl ddH₂O και διάλυμα 2 mg χρωστικής Porcion Red HB σε 100 µl DMSO. Η κόκκινη αυτή χρωστική έχει ικανότητα πρόσδεσης στον βραχίονα. Αφήνονται υπό συνεχή κυκλική ανάδευση (20 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Κατόπιν διηθούνται στην αντλία κενού και ξεπλένονται με ddH₂O. Τα χρώματα ήταν τα αναμενόμενα, υποδηλώνοντας επιτυχία στην παρασκευή του προσροφητή. Το δείγμα χωρίς GSH ήταν έντονα κόκκινο και αυτό με GSH ήταν σχεδόν λευκό, αφού η προσδεμένη GSH δεν επέτρεπε το ανταγωνιστικό δέσιμο των μορίων της χρωστικής πάνω στον προσροφητή.

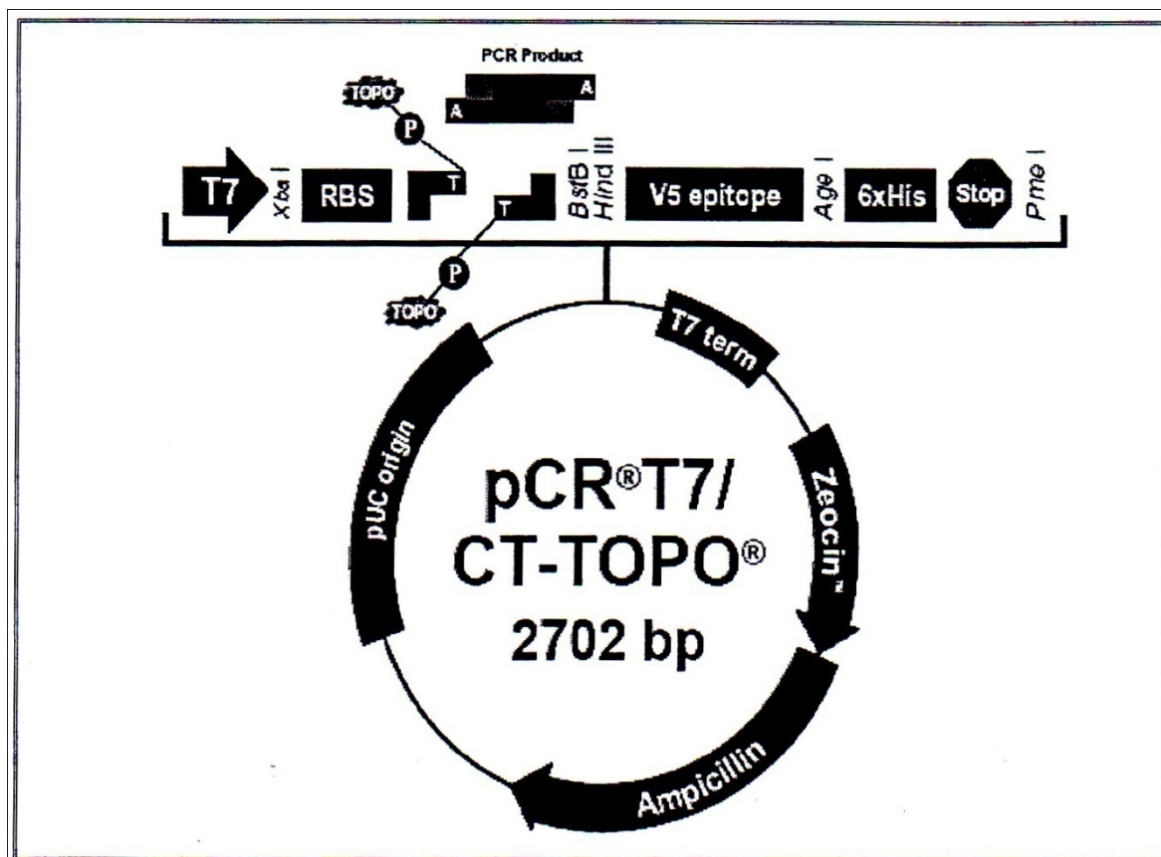
3.12. Ένωση των προϊόντων PCR σε πλασμιδιακό φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10F['] με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Η αντίδραση ένωσης (ligation) των προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. Coli* TOP10F['] με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, έγινε με την τεχνολογία του TOPO[®] Cloning όπως περιγράφεται στον οδηγό pCR[®]T7/CT-TOPO[®]TA Expression Kit (Invitrogen). Αναλυτικότερα ακολουθήθηκαν τα τρία παρακάτω στάδια:

1^ο στάδιο: Ένωση καταλοίπων αδενίνης (A) στα 3' άκρα του πολυνουκλεοτιδικού PCR προϊόντος προκειμένου να μπορεί να γίνει η ενσωμάτωσή του στον πλασμιδιακό φορέα, που με τη σειρά του παρέχεται ήδη ευθύγραμμος, με συμπληρωματικά προεξέχοντα 3' δεοξυθυμιδινο-κατάλοιπα. Για να γίνει η αντίδραση αυτή, αναμειγνύονται 50 λ PCR προϊόντος με 2 Units Taq DNA-πολυμεράσης. Το δείγμα επωάζεται στους 72°C για 10 λεπτά, χρονικό διάστημα κατά το οποίο η Taq DNA-πολυμεράση επιμηκύνει με κατάλοιπα δεοξυαδενοσίνης τα 3' άκρα του PCR προϊόντος, λόγω της δραστηριότητας τελικής 3' τρανσφεράσης που έχει, ανεξαρτήτως ακολουθίας. Αυτό το στάδιο στην παρούσα εργασία δεν πραγματοποιήθηκε, αφού η Go-Taq DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε αφήνει τα 3' άκρα του PCR προϊόντος αδενοσινιομένα.

2^ο στάδιο: Κλωνοποίηση του αδενοσινιομένου PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα (TOPO Cloning Reaction). Έτσι σε eppendorf που βρίσκεται σε πάγο αναμειγνύονται 4 λ PCR προϊόντος, 1 λ διάλυμα αλάτων (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) και 1 λ απ' το πλασμιδιακό φορέα. Για την κλωνοποίηση (ενσωμάτωση) δεν απαιτείται DNA-δεσμάση για την δημιουργία των τελικών 3', 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο πλασμίδιο και το προς ανασυνδυασμό PCR προϊόν. Αυτό εξασφαλίζεται από το ότι σε καθένα απ' τα 3' άκρα του, ο πλασμιδιακός φορέας έχει προσδεμένη την τοποϊσομεράση I του ιού *Vaccinia*, μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στην 3'-υδροξυλομάδα της ακραίας θυμιδίνης και ενός φωσφορυλιωμένου καταλοίπου τυροσίνης (Tyr-274) της τοποϊσομεράσης I. Κατόπιν η τοποϊσομεράση I καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στην κάθε 5'-φωσφορική ομάδα του PCR προϊόντος και της 3'-υδροξυλομάδας του φορέα με την ταυτόχρονη απελευθέρωση του ενζύμου και την αποφωσφορυλίωσή του, η οποία και εξασφαλίζει την απαραίτητη ενέργεια για την κατάλυση τη δημιουργίας του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Το TOPO[®] Cloning λοιπόν εκμεταλλεύεται αυτή την αντίδραση για την επιτυχή και σχετικά αποδοτική κλωνοποίηση PCR προϊόντων.

Η τοποϊσομεράση I φυσιολογικά χρησιμοποιείται από τον ιό *Vaccinia* προκειμένου να κόψει το DNA του κυττάρου-ξενιστή με τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μετά την αλληλουχία 5'-CCCTT-3' σε μία εκ των δύο αλυσίδων του και σε αυτή τη θέση να ενσωματωθεί το ιικό γενετικό υλικό. (Σχήμα 3.1)



Σχήμα 3.1: Οι αλληλουχίες του πλασμιδιακού φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®]. T7 είναι ο υποκινητής του βακτηριοφάγου T7, που χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση του εισηγμένου γονιδίου – προϊόντος PCR. RBS είναι η αλληλουχία από τη μεταγραφή της οποίας θα προκύψει η θέση αναγνώρισης και δέσμευσης της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος για την έναρξη της μετάφρασης από το κωδικόνιο έναρξης του εισηγμένου γονιδίου. Μετά από αυτήν ακολουθεί η θέση εισαγωγής του γονιδίου – PCR προϊόντος. V5 epitope είναι η αλληλουχία που κωδικοποιεί το επιτόπιο V5 πεπτίδιο (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) ώστε να μπορεί να γίνει ανίχνευση συντηγμένων πρωτεϊνών με αντι-V5 αντισώματα. 6xHis είναι η αλληλουχία που κωδικοποιεί ένα αμινοτελικό πεπτίδιο 6 Ιστιδινών που επιτρέπουν το καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης μέσω στήλης Ni-NTA. Stop είναι το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, εφόσον το PCR-προϊόν δεν διαθέτει προκειμένου να εκφραστούν οι επόμενες 2 αλληλουχίες που μόλις αναφέρθηκαν. T7 term είναι οι αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής του βακτηριοφάγου T7. Zeocin και Ampicillin είναι τα γονίδια ανθεκτικότητας στη ζεοκίνη και την αμπικιλίνη αντίστοιχα. pUC origin είναι η θέση έναρξης για την αυτόνομη αντιγραφή του πλασμιδίου εντός βακτηρίων-ξενιστών.

3^ο στάδιο: Γίνεται μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. Coli* TOP10F'. Για να γίνει αυτό, αναμιγνύω με ήπιο τρόπο 25 λ από αυτά τα κύτταρα με 2 λ από το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης και άλλα 25 λ κύτταρα με τα υπόλοιπα 4λ από την αντίδραση σε ξεχωριστά erpendorfs. Τα δύο δείγματα επωάζονται 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηρίων με την επώαση των δύο δειγμάτων στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά επιστρέφουν στον πάγο όπου παραμένουν για άλλα 3 λεπτά. Κατόπιν σε κάθε erpendorf προστίθενται 250 λ θρεπτικού μέσου SOC και αφού αναμειχθούν καλά, επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C υπό οριζόντια ανάδευση στις 200 rpm.

Κατόπιν επιστρώνω 100 λ από το erpendorf όπου προστέθηκαν 4 λ από το προϊόν της αντίδρασης cloning σε ένα τρυβλίο και 200 λ από το άλλο erpendorf σε ένα άλλο τρυβλίο, με την παρουσία φλόγας. Και τα δύο τρυβλία περιέχουν στέρεο LB θρεπτικό μέσο με παρουσία αντιβιοτικού αμικικιλίνη. Αφού περάσουν περίπου 10 λεπτά κάτω από την φλόγα ώστε να στεγνώσουν, τα τρυβλία επωάζονται για 12 – 16 ώρες στους 37°C. Οι αποικίες βακτηρίων που θα προκύψουν θα είναι ανθεκτικές στην αμικικιλίνη και άρα θα έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pCR[®]T7/CT-TOPO[®] που περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αυτό. Κύτταρα *E. coli* TOP10F' μετασχηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR[®]T7/CT-TOPO[®] χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, το οποίο υποβλήθηκε σε αλληλούχιση (MWG, Γερμανία) για την επιβεβαίωση της σωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Τα κύτταρα *E. coli* TOP10F', ο ευθύγραμμος πλασμιδιακός φορέας pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και τα διάφορα διαλύματα, όπως το διάλυμα αλάτων του 2^{ου} σταδίου και το SOC θρεπτικό μέσο, παρέχονται από την Invitrogen.

3.13. Αρχές εξασφάλισης σωστού προσανατολισμού στην ένθεση του γονιδίου στον φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®]

Κατόπιν, από προκαλλιέργειες των βακτηριακών κλώνων (αποικιών) που θα προκύψουν, ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη του με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση (HindIII, BstBI, AgeI, PmeI ή XbaI μιας και η θέση αναγνώρισης τους αντιπροσωπεύεται μια φορά στο συγκεκριμένο πλασμίδιο).

Η περιοριστική αυτή ενδονουκλεάση πρέπει να επιλεγθεί κατάλληλα ώστε να κόβει και μέσα στο γονίδιο (PCR product). Το προϊόν της πέψης αναλύεται σε πήκτη αγαρόζης 1% (w/v).

Από την απόσταση και το επίπεδο των ζωνών στην πήκτη μπορούμε να διαπιστώσουμε ποιοι κλώνοι έχουν ενσωματώσει το γονίδιο με κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορεί αυτό να εκφραστεί αργότερα, δηλαδή θα πρέπει το 5' άκρο της κωδικής αλυσίδας να βρίσκεται προς τον υποκινητή του βακτηριοφάγου T7 που περιέχει ο συγκεκριμένος φορέας. Οι κλώνοι που έχουν μετασηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα δίνουν προφανώς 2 ζώνες στη πήκτη αγαρόζης γιατί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κόβεται από το επιλεγθέν περιοριστικό ένζυμο σε δύο θέσεις, μία μέσα στο γονίδιο και μία μετά το πλασμίδιο. Βακτηριακοί κλώνοι που δίνουν μία μόνο ζώνη έχουν ενσωματώσει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Στην περίπτωση που το γονίδιο είναι σχετικά μικρό (κάτω από 650 ζεύγη βάσεων), όπως συμβαίνει και στην παρούσα μελέτη, αφενός μειώνεται πολύ η πιθανότητα ένα από τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα να αναγνωρίζει εντός του γονιδίου, αφετέρου δυσκολεύει η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων από τον διαχωρισμό των διαφορετικών τμημάτων DNA στην ηλεκτροφόρηση, αφού αυτά θα έχουν μικρή απόκλιση στο μέγεθός τους.

Στην περίπτωση αυτή προχωράμε σε τυχαία επιλογή 12 βακτηριακών κλώνων TOP10F', απομονώνουμε το πλασμιδιακό DNA απ' αυτούς, προχωρούμε στο μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) και τα καλλιεργούμε με επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου και ακόλουθη ανίχνευση του γονιδιακού προϊόντος στις καλλιέργειες από αποικίες που είχαν ενσωματώσει με σωστό προσανατολισμό το εν λόγω γονίδιο, διαπιστώνοντας εκ των υστέρων τον σωστό αυτό προσανατολισμό.

3.14. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* BL21 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και διαδικασία ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου GST σε αυτά

Από προκαλλιέργειες των βακτηριακών κλώνων (αποικιών) *E. Coli* TOP10F' που θα προκύψουν από την παραπάνω διαδικασία, ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Από stock δεκτικών BL21 κυττάρων που έχουμε φτιάξει μεταφέρουμε 75 λ βακτηρίων σε αντίστοιχο αριθμό erpendorfs, όσες και οι αποικίες από τις οποίες απομονώσαμε πλασμιδιακό DNA. Από κάθε erpendorf που περιέχει πλασμιδιακό DNA προερχόμενο από μία αποικία βακτηρίων, μεταφέρουμε 1,5 λ πλασμιδιακού DNA στα 75 λ βακτηρίων και αριθμούμε προσεκτικά τα erpendorfs.

Αφήνονται στον πάγο για 30 λεπτά. Υπόκεινται σε heat shock στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Μεταφέρονται αμέσως ξανά στον πάγο και μετά από 2-3 λεπτά προστίθεται υπό φλόγα 300 λ LB στο καθένα erpendorf. Επιάζονται υπό οριζόντια ανάδευση (>130rpm) για 60 λεπτά.

Κατόπιν βάζω το περιεχόμενο κάθε erpendorf σε αντίστοιχο 5 ml θρεπτικό υλικό LB παρουσία Amp. Οι προκαλλιέργειες επιάζονται στους 37 °C για 12-16 ώρες. Από κάθε προκαλλιέργεια μεταφέρονται 2 ml σε αντίστοιχο falcon που περιέχει 28 ml LB + Amp.

3.15. Διαδικασία ετερόλογης έκφρασης

Μετά από 30-40 λεπτά λαμβάνεται δείγμα από κάθε καλλιέργεια (1 ml) και φωτομετρείται στα 600 nm. Χρησιμοποιείται ως μάρτυρας θρεπτικό υλικό LB + Amp πριν τον εμβολιασμό του. Επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις κάθε περίπου 15 λεπτά. Όταν η Απορρόφηση κάθε καλλιέργειας φθάσει 0,6 προστίθεται IPTG για τελική του συγκέντρωση 1 mM. Κατόπιν κάθε καλλιέργεια επωάζεται για 4 ώρες στους 37°C.

Κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε ψυχομένη φυγόκεντρο (στους 4 °C) στις 8000 rpm για 20 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, κάθε falcon αφήνεται ανεστραμμένο για 2 λεπτά και το ίζημα (τα κύτταρα BL21 που περιέχουν GST) στους -20°C.

3.16. Μακροπρόθεσμη αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων.

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (συνήθως παρουσία αντιβιοτικού για ανθεκτικό στέλεχος) στους 37°C για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή 500 λ μεταφέρονται σε erpendorf στο οποίο προστίθενται 500 λ γλυκερόλης 50% (v/v). Ακολουθεί καλή ανάμειξη. Τα δείγματα κυττάρων αποθηκεύονται στους -80°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Απομόνωση των διαφορετικών ισοτύπων των γονιδίων που κωδικοποιούν τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.

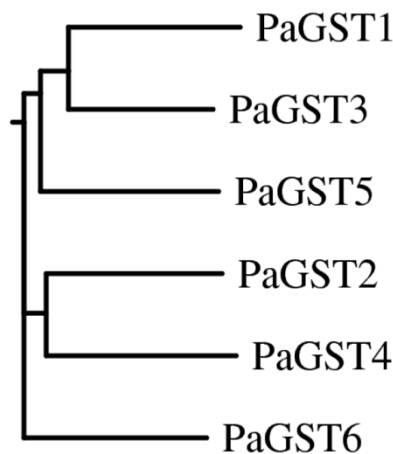
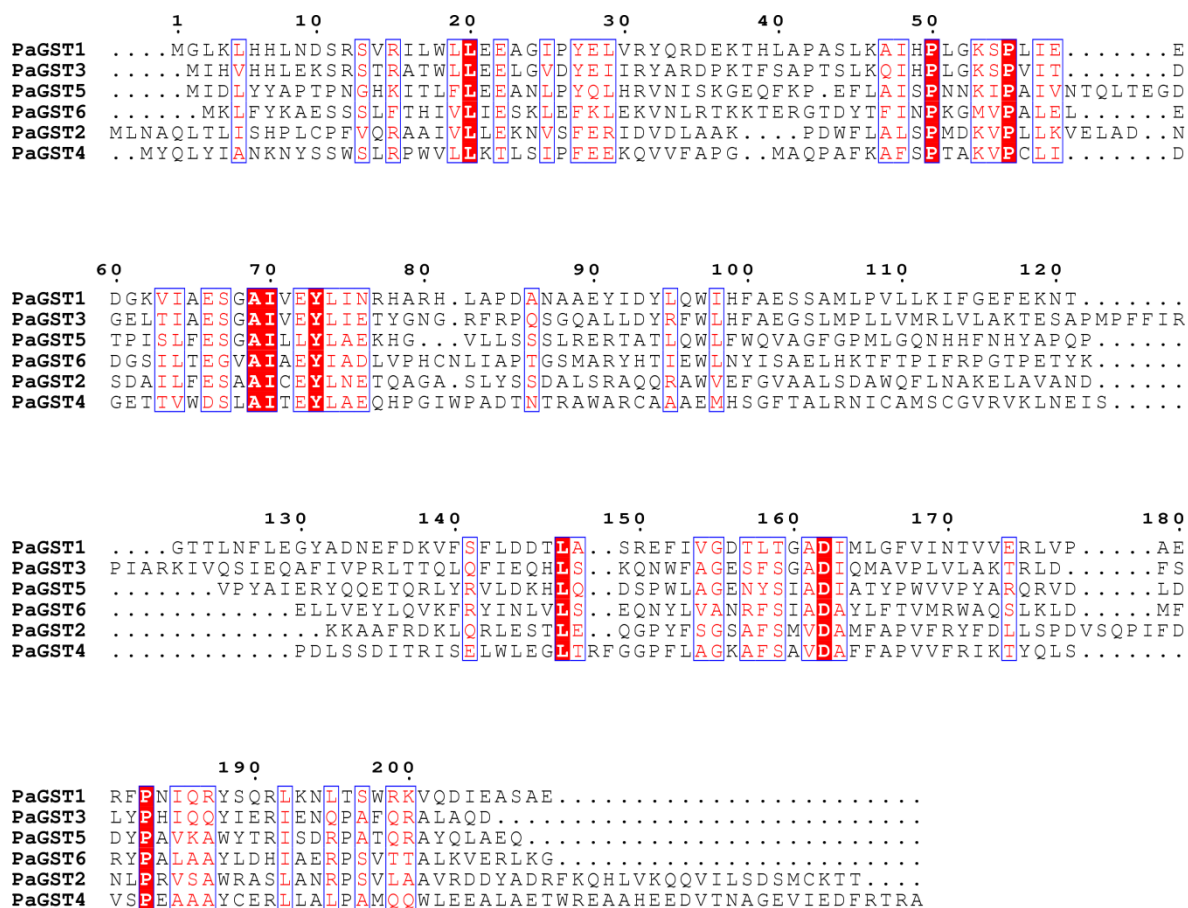
4.1.1. Βιοϋπολογιστική ανάλυση.

Στην *Erwinia carotovora* εντοπίζονται τουλάχιστον έξι γονίδια που φαίνεται να κωδικοποιούν τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Σκοπός ήταν η κλωνοποίηση και η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων αυτής της οικογένειας στο βακτήρια *E. coli*. Κατόπιν τα ένζυμα αυτά θα μπορέσουν να χαρακτηρισθούν και να μελετηθούν ως προς την κινητική τους συμπεριφορά και την ενεργότητά τους σε διαφορετικά υποστρώματα και υπό διάφορες συνθήκες.

Τα γονίδια που επιλέχτηκαν από την *E. carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043 για μελέτη και οι αντίστοιχοι κωδικοί κατάθεσης (σε παρένθεση είναι οι συντομογραφίες που δόθηκαν) στη βάση δεδομένων NCBI είναι:

Glutathione S transferase	YP_049179 (PaGST1)
Probable glutathione S transferase	YP_049688 (PaGST2)
Glutathione S transferase	YP_050035 (PaGST6)
Putative glutathione S transferase	YP_050807 (PaGST3)
Putative glutathione S transferase	YP_050882 (PaGST4)
Putative glutathione S transferase	YP_051134 (PaGST5)

Αρχικά οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε αμινοξική στοίχιση όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1. Οι ομοιότητες σε αμινοξικό επίπεδο φαίνεται στον Πίνακα 4.1. Είναι φανερό ότι οι αλληλουχίες διαθέτουν χαμηλά ποσοστά ομοιότητας.



Εικόνα 4.1. Στοιχισή των αλληλουχιών των GST ενζύμων που επιλέχθηκαν από την *E. carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043 για μελέτη και το αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο. Η στοιχισή έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W.

Πίνακας 4.1. Σύγκριση των GST ενζύμων που επιλέχτηκαν από την *E. carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043 για μελέτη.

Όνομα	Μέγεθος αλληλουχίας	Όνομα	Μέγεθος αλληλουχίας	Score
PaGST1	209	PaGST2	230	11.0
PaGST1	209	PaGST3	214	33.0
PaGST1	209	PaGST4	228	7.0
PaGST1	209	PaGST5	208	21.0
PaGST1	209	PaGST6	202	21.0
PaGST2	230	PaGST3	214	18.0
PaGST2	230	PaGST4	228	23.0
PaGST2	230	PaGST5	208	17.0
PaGST2	230	PaGST6	202	22.0
PaGST3	214	PaGST4	228	16.0
PaGST3	214	PaGST5	208	26.0
PaGST3	214	PaGST6	202	20.0
PaGST4	228	PaGST5	208	18.0
PaGST4	228	PaGST6	202	15.0
PaGST5	208	PaGST6	202	19.0

Για την κλωνοποίηση των παραπάνω γονιδίων η διαδικασία που ακολουθήθηκε μπορεί να αναλυθεί σε επιμέρους βήματα:

1) Αρχικά απομονώθηκαν οι έξι διαφορετικοί ισότυποι των γονιδίων που κωδικοποιούν τρανσφεράσες της γλουταθειόνης από το γονιδίωμα της *Erwinia carotovora* μέσω της μεθόδου PCR.

2) Κατόπιν κλωνοποιήθηκαν αυτά τα γονίδια στον πλασμιδιακό φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και κατόπιν μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* TOP10F' με τους ανασυνδυασμένους φορείς.

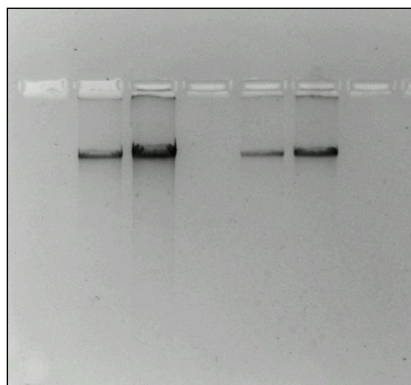
3) Από την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων σε στέρεο θρεπτικό υλικό επιλέχθηκαν 12 αποικίες για κάθε διαφορετικό ισότυπο. Από αντίστοιχες προκαλλιέργειες των αποικιών αυτών απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA.

4) Κατόπιν μετασχηματίστηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες, όπου γίνεται επαγωγή έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου με IPTG.

5) Από το εκχύλισμα των κυττάρων αυτών μετρήθηκε η δραστικότητα του αντίστοιχου ενζύμου μέσω του προσδιορισμού της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου GS-CDNB που προσδιορίζεται φωτομετρικά.

4.1.2. Απομόνωση γενωματικού DNA από *Erwinia carotovora*

Για να προχωρήσω στην απομόνωση έπρεπε να απομονώσουμε το γενωματικό DNA του βακτηρίου *Erwinia carotovora*. Για να γίνει αυτό χρησιμοποίησα το αντίστοιχο kit της Sigma-Aldrich, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Τα δύο κλάσματα έκλουσης που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο απομόνωσης του γενωματικού DNA αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης, προκειμένου να διαπιστωθεί η απομόνωση του γενετικού υλικού (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1. Ανάλυση γενωματικού DNA του βακτηρίου *Erwinia carotovora*. Φαίνονται τα περιεχόμενα σε δύο διαφορετικές ποσότητες από κάθε κλάσμα έκλουσης.

4.1.3. Αντίδραση PCR για την απομόνωση και την ενίσχυση των γονιδίων των διαφορετικών ισοτύπων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από γενωματικό DNA

Στην συνέχεια για την απομόνωση και ενίσχυση των 6 αυτών γονιδίων από το γενωματικό DNA του βακτηρίου *E. carotovora*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR. Δοκιμάστηκε και αξιολογήθηκε μια πληθώρα συνθηκών (κυρίως η θερμοκρασία επανυβριδοποίησης του γενωματικού DNA με τους εκκινητές) και συγκεντρώσεων των συστατικών μέχρι να έχω το επιθυμητό αποτέλεσμα. Το πρωτόκολλο το οποίο ήταν επιτυχημένο παρουσιάζεται στις μεθόδους.

Αρχικά σχεδιάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών και για τα 6 γονίδια της οικογένειας με τον τρόπο που περιγράφεται στις μεθόδους. Αυτοί παραγγέλθηκαν και κατασκευάστηκαν από την γερμανική Eurofins MWG GmbH. Παρακάτω ακολουθούν τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών με πρώτο τον FGC και δεύτερο τον RGC.

Για τον ισότυπο YP_049688:

5' –ATG CTT AAC GCT CAG TTG ACG CTT A- 3'

5' –TCA GGT TGT CTT ACA CAT TGA GTC T- 3'

Για τον ισότυπο YP_051134:

5' –ATG ATT GAC CTG TAT TAC GCA CCA A- 3'

5' –TTA CTG CTC GGC TAG CTG GTA AGC C- 3'

Για τον ισότυπο YP_050035:

5' –ATG AAA CTG TTT TAC AAA GCT GAA A- 3'

5' –TTA TCC TTT CAA CCT TTC AAC TTT A- 3'

Για τον ισότυπο YP_050807:

5' –ATG ATA CAC GTT CAT CAC CTC GAA A- 3'

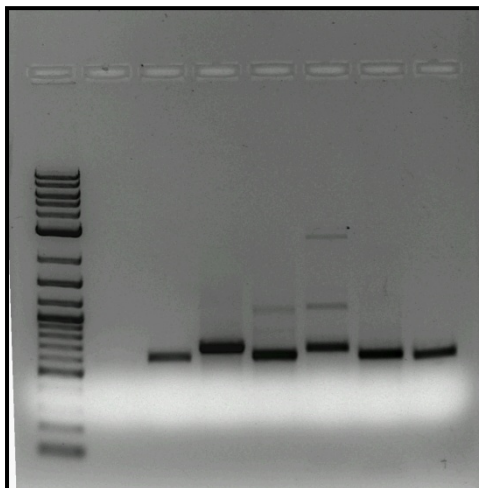
5' –TTA ATC CTG AGC AAG AGC CCG TTG A- 3'

Για τον ισότυπο YP_050882:

5' –ATG TAT CAG TTG TAC ATC GCC AAT A- 3'

5' –TTA CGC GCG AGT GCG AAA ATC CTC T- 3'

Στην επόμενη σελίδα (Σχήμα 4.2.) παρουσιάζεται η ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης των προϊόντων PCR και για τα 6 γονίδια. Στην 1^η θέση ο marker, στην 3^η για τον ισότυπο YP_049179, στην 4^η για τον ισότυπο YP_049688, στην 5^η για τον ισότυπο YP_050807, στην 6^η για τον ισότυπο YP_050882, στην 7^η για τον ισότυπο YP_051134 και στην 8^η για τον ισότυπο YP_050035. Χρησιμοποιήθηκε η ίδια θερμοκρασία επανυβριδοποίησης (43°C) και 1λ αραιωμένη 1/10 μήτρα γενωματικού DNA.

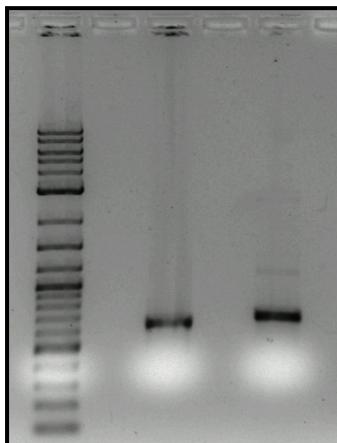


Σχήμα 4.2. Ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης των προϊόντων PCR για τα έξι γονίδια. Στην 1^η θέση ο marker, στην 3^η για τον ισότυπο YP_049179, στην 4^η για τον ισότυπο YP_049688, στην 5^η για τον ισότυπο YP_050807, στην 6^η για τον ισότυπο YP_050882, στην 7^η για τον ισότυπο YP_051134 και στην 8^η για τον ισότυπο YP_050035.

Παρατηρούμε ότι ενώ υπήρξε πολύ καλό επίπεδο ενίσχυσης για τα γονίδια και των 6 ισότυπων, υπάρχουν και άλλα παραπροϊόντα PCR για τους ισότυπους YP_050807 και YP_050882 (5^η και 6^η θέση αντίστοιχα). Αυτό σημαίνει ότι οι εκκινητές σε αυτή τη θερμοκρασία επανυβριδοποίησης (43°C) υβριδοποιούνται ασθενώς και σε άλλες εν μέρει συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να αντιγράφονται ασθενώς και άλλες αλληλουχίες.

Για το λόγο αυτό επαναλαμβάνεται η διαδικασία PCR μόνο για την απομόνωση και ενίσχυση των γονιδίων των δύο αυτών ισότυπων, αυτή τη φορά σε θερμοκρασία επανυβριδοποίησης 47°C, ώστε να μειωθεί ο υβριδισμός με λιγότερο συμπληρωματικές αλληλουχίες στο γενωματικό DNA της *E. carotovora*.

Στην επόμενη σελίδα (Σχήμα 4.3) παρουσιάζεται η ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης των προϊόντων PCR για τα 2 αυτά γονίδια. Στην 1^η θέση ο marker, στην 3^η το προϊόν PCR για τον ισότυπο YP_050807 και στην 5^η θέση το προϊόν PCR για τον ισότυπο YP_050882.

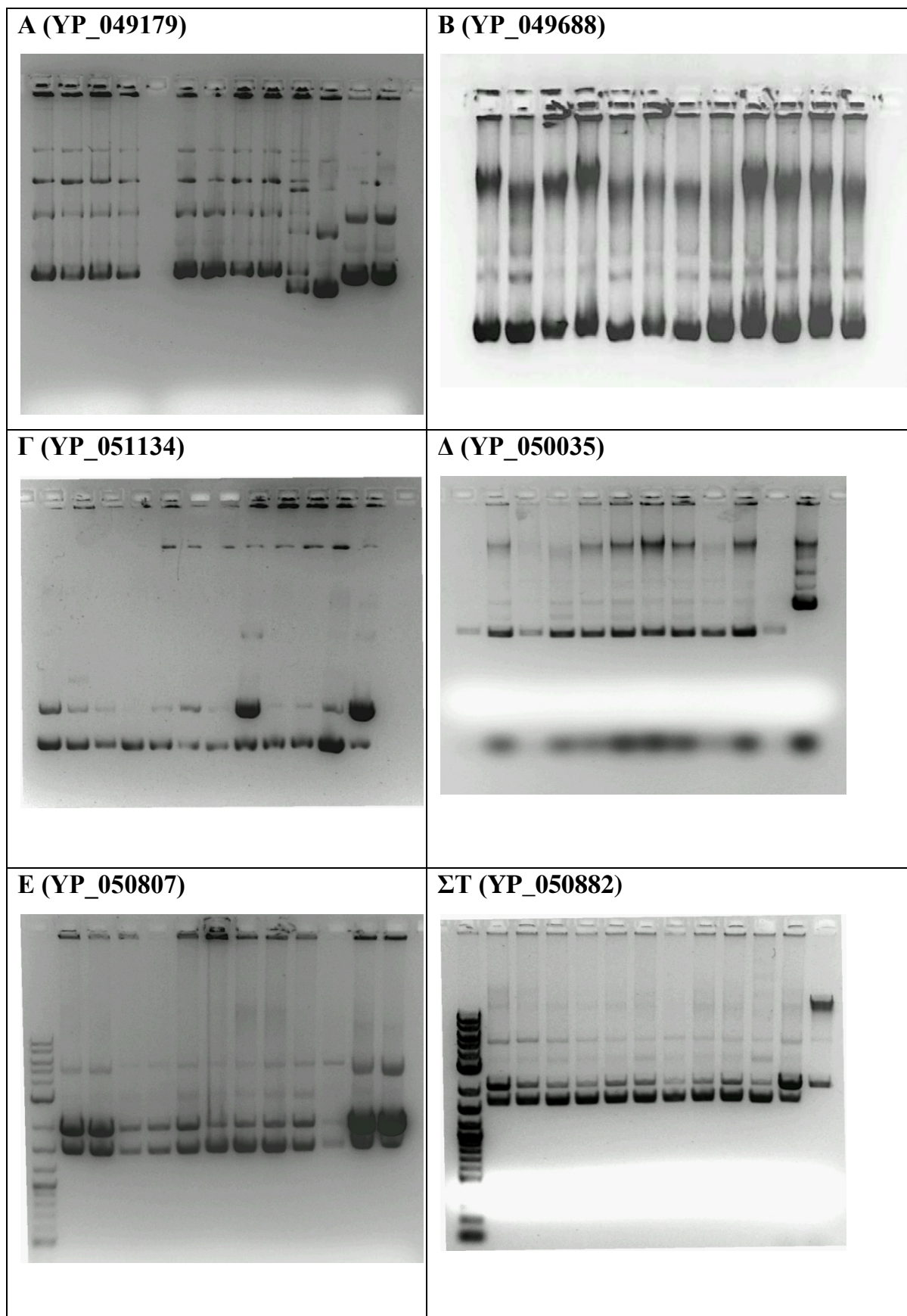


Σχήμα 4.3. Ανάλυση σε πήκτη αгарόζης των προϊόντων PCR. Στην 1^η θέση ο marker, στην 3^η το προϊόν PCR για τον ισότυπο YP_050807 και στην 5^η θέση το προϊόν PCR για τον ισότυπο YP_050882.

Πλέον τα προϊόντα PCR και για τους ισοτύπους YP_050807 και YP_050882 είναι αρκούτως καθαρά για να προχωρήσουμε στην κλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακούς φορείς pCR[®]T7/CT-TOPO[®].

4.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR στον φορέα pCR[®]T7/CT-TOPO[®] και μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10F' με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Η διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν περιγραφεί αναλυτικά στις μεθόδους και καταλήγουν στην απομόνωση πλασμιδιακού DNA από 12 βακτηριακούς κλώνους *E. coli* TOP10F'. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αναλύσεις σε πήκτη αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA αυτών των βακτηριακών κλώνων σε κάθε περίπτωση ανασυνδυασμού του με το αντίστοιχο γονίδιο των 6 διαφορετικών ισοτόπων (Σχήμα 4.4).



Σχήμα 4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από 12 βακτηριακούς κλώνους *E. coli* TOP10F'.

4.3. Προσδιορισμός ενεργότητας των διαφόρων ισοτύπων τρανσφερασης της γλουταθειόνης μετά την ετερόλογη έκφραση στα κύτταρα *E. coli* BL21 DE3.

Επιλεγμένοι κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 DE3. Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας και η απορρόφηση κάθε καλλιέργειας φθάσει 0,6 προστίθεται IPTG για τελική του συγκέντρωση 1 mM. Κατόπιν κάθε καλλιέργεια επωάζεται για 4 ώρες στους 37°C. Κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε ψυχομένη φυγόκεντρο (στους 4 °C) στις 8000 rpm για 20 λεπτά. Για τη λύση των κυττάρων γίνεται εφαρμογή υπερήχων για 15 δευτερόλεπτα εντός του διαλύματος με την ειδική συσκευή υπερήχων. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5-10 min στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέγεται και πραγματοποιείται δοκιμασία Bradford και φωτομετρικός προσδιορισμός των διαφόρων ισοτύπων τρανσφερασης της γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.2 και σχηματικά στο σχήμα 4.11.

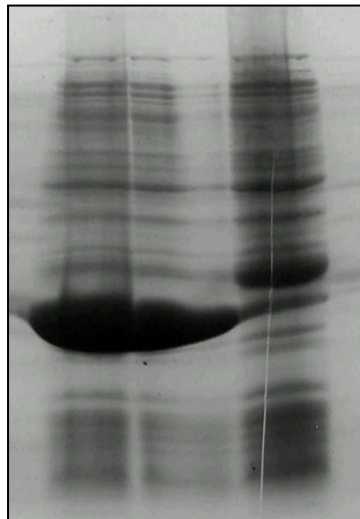
Πίνακας 4.2. Συγκριτικός πίνακας για την ενεργότητα με χρήση CDNB/GSH σαν σύστημα υποστρωμάτων.

Ισότυποι GSTs της <i>Er. car.</i>	Αριθμός κλώνου	Units /ml	Ειδική δραστηριότητα
YP_049179	No 5	2,28	0,21
YP_049688	No 4	0,02	0,0018
YP_050807	No 4	0,22	0,036
YP_050882	No 4	0,036	0,00259
YP_051134	No 2	0,66	0,051
YP_050035	No 2	0,13	0,031

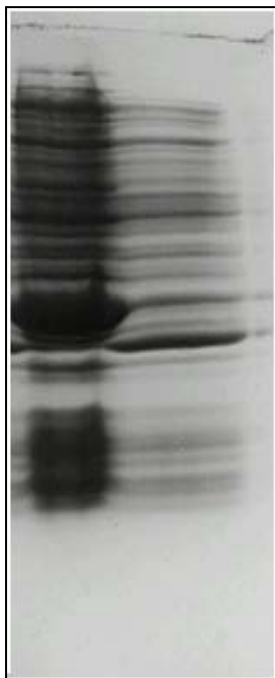
Ακολούθως στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα Σχήματα 4.5-4.10.



Σχήμα 4.5. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του εκχυλίσματος από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με το γονίδιο YP_049688. Στη θέση 1 (από αριστερά) φαίνεται το δείγμα και στη θέση 2 είναι το control (μετασχηματισμένα *E. coli* BL21 (DE3) με τυφλό πλασμίδιο).



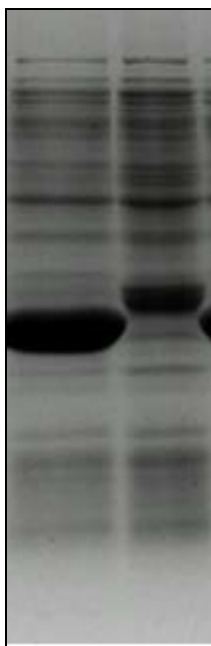
Σχήμα 4.6. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του εκχυλίσματος από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με το γονίδιο YP_051134. Στη θέση 1 και 2 (από αριστερά) φαίνεται το δείγμα και στη θέση 3 είναι το control (μετασχηματισμένα *E. coli* BL21 (DE3) με τυφλό πλασμίδιο).



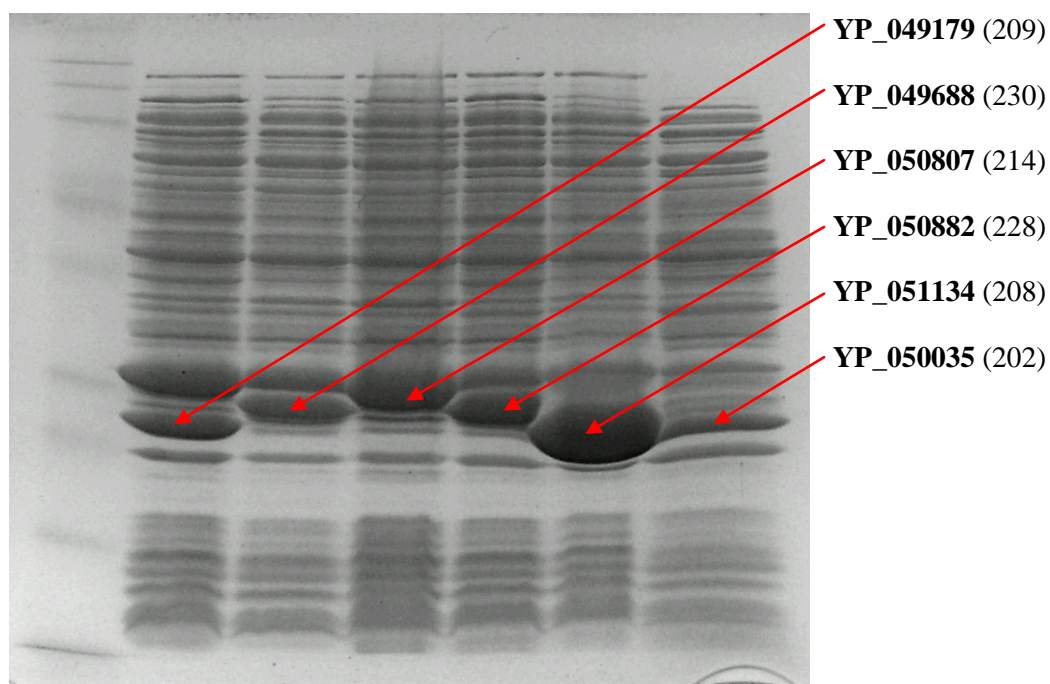
Σχήμα 4.7. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του εκχυλίσματος από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με το γονίδιο YP_050035. Στη θέση 2 (από αριστερά) φαίνεται το δείγμα και στη θέση 1 είναι το control (μετασχηματισμένα *E. coli* BL21 (DE3) με τυφλό πλασμίδιο).



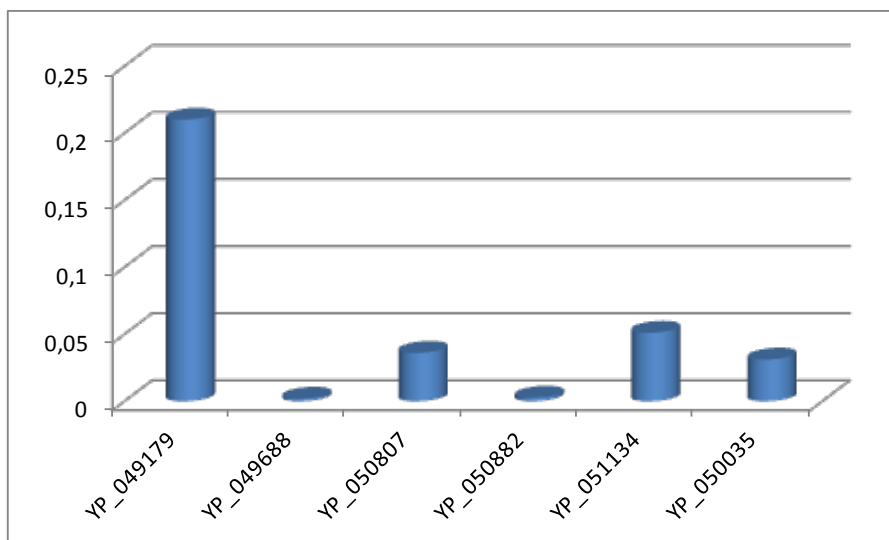
Σχήμα 4.8. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του εκχυλίσματος από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με το γονίδιο YP_050807. Στη θέση 1 (από αριστερά) φαίνεται το δείγμα και στη θέση 2 είναι το control (μετασχηματισμένα *E. coli* BL21 (DE3) με τυφλό πλασμίδιο).



Σχήμα 4.9. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του εκχυλίσματος από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με το γονίδιο YP_050882. Στη θέση 1 (από αριστερά) φαίνεται το δείγμα και στη θέση 2 είναι το control (μετασηματισμένα *E. coli* BL21 (DE3) με τυφλό πλασμίδιο).

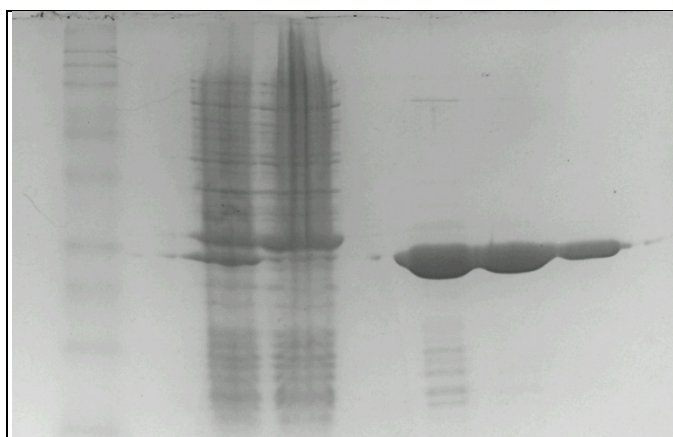


Σχήμα 4.10. Συγκενρωτική ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) των εκχυλισμάτων από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) για όλους τους διαφορετικούς ισότυπους GST γονιδίων (σε παρένθεση ο αριθμός των αμινοξέων τους). Αριστερά ο marker.



Σχήμα 4.11. Συγκριτικός αναπαράσταση της ειδικής δραστηριότητας των επιλεγμένων GSTs. Η ενζυμική ενεργότητα προσδιορίστηκε με χρήση CDNB/GSH σαν σύστημα υποστρωμάτων.

Ακολούθως έγινε προσπάθεια καθαρισμού των ισότυπων από *E. carotovora* με εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας σε προσροφητή με ακινητοποιημένη GSH και βραχίονα 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα. Ο προσροφητής συντέθηκε χρησιμοποιώντας ως φορέα Sepharose CL 6B. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης ο προσροφητής δοκιμάστηκε για την ικανότητα του να καθαρίζει ανασυνδυασμένες GSTs χρησιμοποιώντας σα μοντέλο το ισόένζυμο GSTA1-1 από άνθρωπο. Οι συνθήκες προσρόφησης και πλύσεων ήταν 20mM KH_2PO_4 , pH=7 και η έκλυση πραγματοποιήθηκε εκλεκτικά χρησιμοποιώντας 10 ml του ρυθμιστικού που περιέχει διαλυμένη 10 mM GSH. Τα αποτελέσματα μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό φαίνονται στο Σχήμα 4.12 από το οποίο φαίνεται η αποτελεσματικότητα του προσροφητή. Ακολούθως επιχειρήθηκε να πραγματοποιηθεί καθαρισμός των ισότυπων από *E. carotovora* στον ίδιο προσροφητή. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες προσρόφησης 20mM KH_2PO_4 , pH=7. Σε όλες τις προσπάθειες που έγιναν ο προσροφητής δεν ήταν αποτελεσματικός στην προσρόφηση του ενζύμου κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά των ισότυπων από *E. carotovora*.



Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) του καθαρισμού του ενζύμου hGSTA1-1 από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Στην δεύτερη θέση φαίνεται οι μάρτυρες μοριακής μάζας, στην τέταρτη θέση το crude, στην πέμπτη θέση το μη προσροφημένο κλάσμα. Στις υπόλοιπες τρεις θέσεις βλέπουμε τα κλάσματα των εκλούσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτήριο *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043 είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φυτοπαθογόνο στέλεχος που μπορεί να προκαλεί ασθένειες σε πολλούς φυτικούς ιστούς που εισβάλλει. Επηρεάζει πάρα πολλά καλλιεργήσιμα είδη, όπως καρότα, κρεμμύδια, αγγούρια, τομάτες, μαρούλια και κυρίως τις πατάτες. Αυτό το στέλεχος είναι η κύρια αιτία σαπίσματος και μαυρίσματος της πατάτας και γι' αυτό δημιουργεί πολύ μεγάλο πρόβλημα στην παραγωγή πατάτας.

Εκτός αυτού, ένα τόσο πετυχημένο φυτοπαθογόνο οπωσδήποτε διαθέτει μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορεί να παρακάμπτει τους μηχανισμούς άμυνας και κυρίως να ανθίσταται στις τοξικές αμυντικές ουσίες που παράγουν τα προσβαλλόμενα φυτά. Σε αυτές περιλαμβάνονται φαινολικές ουσίες όπως τα φλαβονοειδή, τα τερπένια, αζωτούχες ενώσεις, όπως τα αλκαλοειδή και τα θειογλυκοσίδια, καθώς και οι φυτοαλεξίνες. Η μελέτη λοιπόν τέτοιων βακτηρίων, όπως η *E. carotovora*, μπορεί επιπλέον να μας αποκαλύψει εξαιρετικά ενδιαφέροντα και ικανά ένζυμα αποτοξίνωσης και αποδόμησης τοξικών ουσιών που να μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

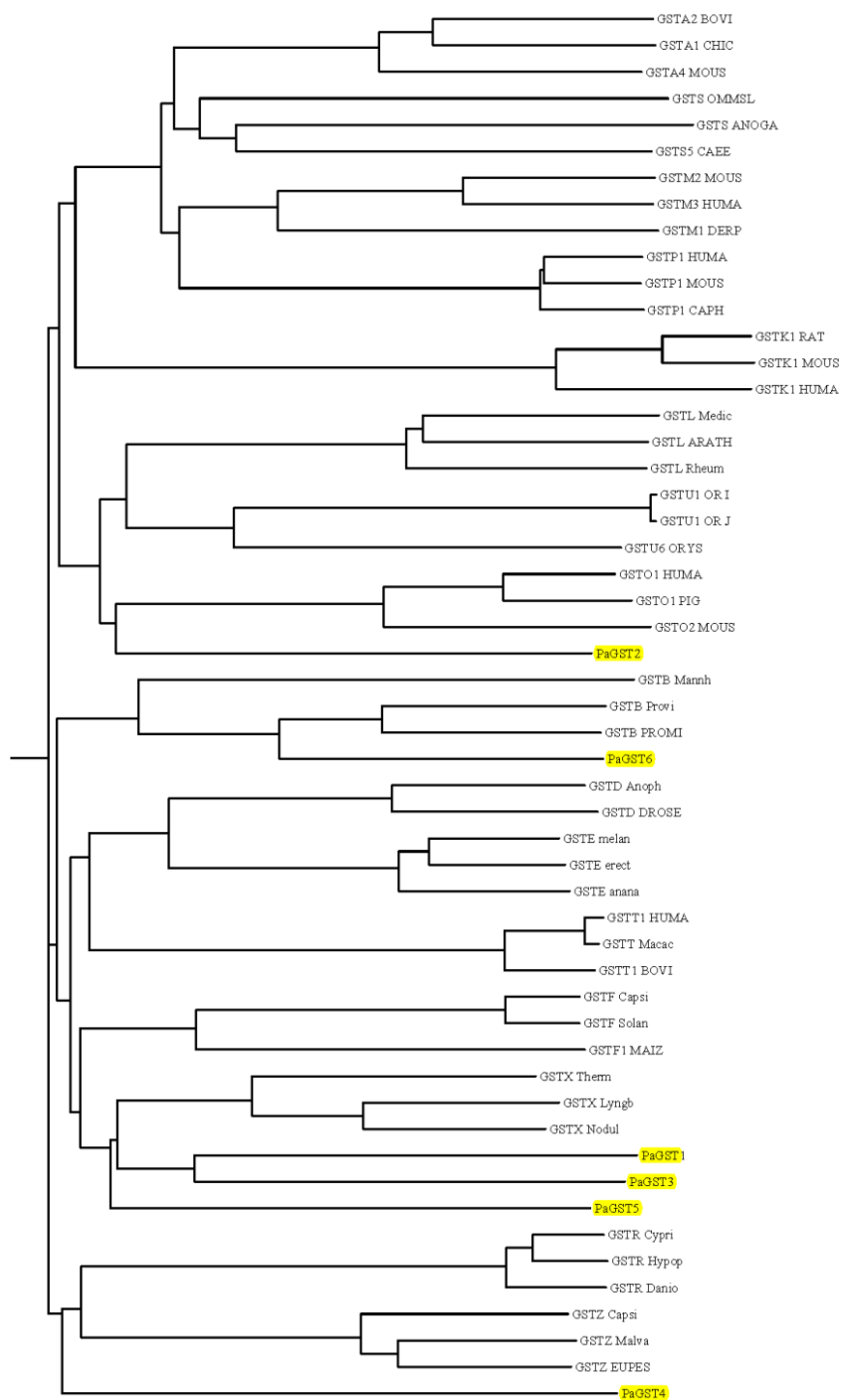
Κλασικά τέτοια ένζυμα είναι οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Πράγματι, όλες οι παραπάνω ενώσεις μπορούν να αποτελούν υποστρώματα ευπρόσβλητα από τη πυρηνόφιλη γλουταθειόνη, δηλαδή είναι πιθανά υποστρώματα ενζύμων GSTs. Υπάρχει λοιπόν ενδιαφέρον στη μελέτη των ενζύμων GSTs του βακτηρίου αυτό, αφού πιθανότατα έχουν μεγάλη ικανότητα αποδόμησης μεγάλου αριθμού ουσιών, αντίστοιχου με το ρεπερτόριο των αμυντικών φυτικών ουσιών που πιθανότατα αντιμετωπίζουν.

Αρχικά στο γονιδίωμα του στελέχους αυτού βρέθηκαν εννέα αλληλουχίες που θεωρήθηκε ότι θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε GSTs. Νεότερες εκτιμήσεις δεδομένων από έρευνες βιοπληροφορικής καταλήγουν πως το βακτήριο πιθανότατα διαθέτει έξι ισοτύπους πιθανών GSTs. Απ' αυτούς μόνο ο ισότυπος YP_049179 (PaGST1) εμφανίζει υψηλή καταλυτική ικανότητα απέναντί του συστήματος υποστρωμάτων GSH/CDNB.

Οι άλλοι ισότυποι παρουσιάζουν χαμηλότερη καταλυτική δράση απέναντι του συστήματος υποστρωμάτων GSH/CDNB. Βέβαια η ενεργότητα απέναντι στο σύστημα GSH/CDNB δεν είναι από μόνο του ισχυρό κριτήριο για την καταλυτική ικανότητα μιας GST. Οι GSTs δείχνουν εντυπωσιακά μεγάλη ετερογένεια κατάλυσης απέναντι σε διαφορετικά υποστρώματα. Αυτός άλλωστε είναι ένας λόγος για την μελέτη των ενζύμων της οικογένειας αυτής, αφού μπορούν να αποκαλυφθούν σπάνιες καταλυτικές ιδιότητες σε συγκεκριμένα ένζυμα, ανοίγοντας σε αυτά ξεχωριστούς δρόμους αξιοποίησης σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Μετά από συγκριτική επεξεργασία των πρωτεϊνικών τους αλληλουχιών, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με εκπροσώπους από όλες τις χαρακτηρισμένες κλάσεις και την ομάδα των GSTs του *E. carotovora* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 5.1. Από το δένδρο φαίνεται ότι η PaGST1,3,5 συγκλίνουν περισσότερο με τις GSTs από την κλάση chi που είναι βακτηριακής προέλευσης. Η PaGST6 είναι κοντά στην οικογένεια των GSTs από την κλάση Beta που είναι βακτηριακής προέλευσης. Η PaGST2 εμφανίζει κάποια μικρή σχέση με τις GSTs κλάσης Omega και τέλος η PaGST4 δεν φαίνεται να συγκλίνει με κάποια γνωστή κλάση. Η ανάλυση βέβαια αυτή δεν είναι ισχυρό κριτήριο ταξινόμησης αφού γενικά στις GSTs παρατηρείται υψηλή ανομοιογένεια.

Για το σχήμα της 5.1 της επόμενης σελίδας: Φυλογενετικό δέντρο αλληλουχιών με εκπροσώπους από όλες τις χαρακτηρισμένες κλάσεις και την ομάδα των GSTs από *E. carotovora* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (PaGST1-PaGST6). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Alpha, (Q08392 , O18879, P24472); Beta, (P15214, D4C334, A7JQU5); Delta, (B0W6B0, Q9GNE9, B4HHD9); Epsilon, (B3NMR7, Q7KK90, B3MBB5); Phi, (A5YWI8, Q5DUH0, P12653), Kappa, (Q9DCM2, P24473, Q9Y2Q3); Lambda, (B7FHT3, Q9LZ06, B5M1W3); Mu, (P21266, P15626, P46419); Omega, (Q9N1F5, P78417, Q8K2Q2); Pi, (P09211, Q9TTY8, P19157); Ro, (A7XZW2, Q0GZP3, Q1L907); Sigma, (Q09596, P46088, P46428); Theta, (E2RD21 , P30711, Q2NL00); Tau, (Q10CE7, A2XMN2, Q06398), Chi, (A0ZF61, A0YYY7, Q8DMB4); Zeta, (P57108, Q84VH0, Q8H1P7, P28342).



Σχήμα 5.1.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε το πρώτο βήμα για κάθε βιοτεχνολογική εφαρμογή, για κάθε ενζυμική μελέτη: δηλαδή η απομόνωση του αντίστοιχου γονιδίου, η κλωνοποίηση, μέσω των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA, και η ετερόλογη έκφραση τους σε βακτήρια *E. coli*, που είναι εξαιρετικά μελετημένα και καλλιεργούνται εύκολα, αφού διαιρούνται σχετικά γρήγορα και δεν είναι ιδιαίτερα απαιτητικά σε θρεπτικό υλικό και λοιπές συνθήκες ανάπτυξης.

Αυτό έγινε κατορθωτό για τα γονίδια και των έξι ισοτύπων GST. Με τις δυνατότητες που μας δίνουν τα συστήματα ετερόλογης έκφρασης, μπορούμε ανά πάσα στιγμή να συνθέσουμε μεγάλα ποσά αυτών των ενζύμων, κάτι που επιτρέπει την άμεση έναρξη βιοχημικών μελετών σε αυτά.

Πρώτο βήμα σε αυτή την πορεία μελετών θα είναι ο αποδοτικός καθαρισμός αυτών των ενζύμων. Μετά μπορεί να ακολουθήσει η μελέτη της καταλυτικής τους ικανότητας απέναντι σε πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων, όπως είναι τα διάφορα ζιζανιοκτόνα, και να μελετηθεί η κινητική τους.

Εφόσον αναδειχθούν από τις μελέτες αυτές ενδιαφέρουσες προοπτικές αξιοποίησης των ενζύμων αυτών, μπορεί να ακολουθήσει η αποκάλυψη της τρισδιάστατης δομής τους, πέραν των δυνατοτήτων που ήδη μας παρέχουν τα βιοτεχνολογικά εργαλεία στη πρόβλεψή της. Ταυτόχρονα θα μπορούν να αρχίσουν προσπάθειες τροποποίησης και βελτίωσης της δραστηριότητάς τους προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις με την αξιοποίηση τόσο ορθολογικών όσο και στοχαστικών μεθόδων. Απώτερος σκοπός είναι να αποκτήσουμε γονίδια τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγονίδια για την γενετική τροποποίηση οργανισμών προκειμένου αυτοί να μπορούν να αξιοποιηθούν σε πλήθος εφαρμογών, αντίστοιχων των δυνατοτήτων που μπορούν να μας δώσουν οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allocati N, Casalone E, Masulli M, Ceccarelli I, Carletti E, Parker MW, Di Ilio C (1999). Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1. FEBS Lett., 445(2-3): 347-350.

Allocati N, Favalaro B, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. 2003. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem. J.* 373:305–11

Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 1997 Jan;10(1):2–18.

Armstrong RN, 1998. Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 618-623

Bijornestedt R., Tardioli S., Mannervik B., 1995. The high activity of rat GST8-8 with alkene substrates is dependent on a glycine residue in the active side. *J. Biol. Chem.* 270: 29705–9

Board P.G., Baker R.T., Chelvanayagam G., Jermiin L.S., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferase in a large range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328(3): 929-935.

Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermiin L.S., Schulte G. K., Danley D.E., Hoth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Rosner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghegan K.F. & Pandit J, 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 24798–24806.

Bresell A., Weinander R., Lundqvist G., 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272(7): 1688-1703.

Broo, K., Larsson, A.-K., Jemth, P., and Mannervik, B. (2002) An ensemble of theta class glutathione transferases with novel catalytic properties generated by stochastic recombination of fragments of two mammalian enzymes. *J. Mol. Biol.* 318, 59-70

Caccuri AM, Antonini G, Allocati N, Di Ilio C, De Maria F, et al. 2002. GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*. A snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* 277:18777–84

Anna Maria Caccuri; Giovanni Antonini; Paolo Ascenzi; M Nicotra; Marzia Nuccetelli; Anna P Mazzetti; Giorgio Federici; Mario Lo Bello; Giorgio Ricci
Temperature adaptation of glutathione S-transferase P1-1. A case for homotropic regulation of substrate binding. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(27):19276-80

Caccuri, A.M., Antonini, G., Nicotra, M., Battistoni, A., Lo Bello, M., Board, P.G., Parker, M.W., Ricci, G., 1997. Catalytic mechanism and role of hydroxyl residues in the active site of theta class glutathione S–transferases: investigation of Ser–9 and Tyr–113 in a glutathione S–transferase from the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *J Biol. Chem.* 272, 29681–29686.

Caccuri, A., Ascenzi, P., Antonini, G., Parker, M., Oakley, A., Chiessi, E., Nuccetelli, M., Battistoni, A., Bellizia, A. and Ricci, G. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 16193–16198.

Collison E.J., Grant C.M., 2003. Role of yeast glutaredoxins as GSTs. *J. Biol. Chem.* 278, 22492-97.

Cromer BA, Morton CJ, Board PG, Parker MW (2002). From glutathione transferase to pore in a CLIC. *Eur. Biophys. J.* 31(5): 356-364.

Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem.* 1994; 220(3):645–661.

Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R (1998). Glutathionemediated detoxification system in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(3): 258-266.

Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3(3): 1-10.

Dixon DP, McEwen AG, Laphorn AJ, Edwards R (2003). Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 278(26): 23930-23935.

Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. 2001 The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J. Biol. Chem.* 276:3319–23

Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000). Plant glutathione Stransferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5(5): 193-198.

Edwards R & Dixon DP (2005) Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401, 169-186.

Engle MR, Singh SP, Czernik PJ, Gaddy D, Montague DC, et al. 2004. Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194(3):296–308

Epp O, Ladenstein R, Wendel A (June 1983). "The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution". *Eur. J. Biochem.* **133** (1): 51–69

Erhardt J, Dirr H., 1995. Native dimer stabilizes the subunit tertiary structure of porcine class pi glutathione S-transferase. *Eur J Biochem.* 230(2):614–620.

Fernandez-Canon JM, Baetscher MW, Finegold M, Burlingame T, Gibson KM, Grompe M. 2002. Maleylacetoacetate isomerase (*MAAI/GSTZ*)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism. *Mol. Cell. Biol.* 22:4943–51

Frova C (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plantarum*, 119(4): 469-479.

Frova C (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23(4): 149-169.

Hansson LO, Bolton-Grob R, Massoud T, Mannervik B. Evolution of differential substrate specificities in Mu class glutathione transferases probed by DNA shuffling. *J Mol Biol.* 1999 Mar 26;287(2):265–276

Harris, J.M., Meyer, D.J., Coles, B., and Ketterer, B. 1991. A novel glutathione transferase (13–13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class θ enzymes. *Biochem. J.* 278 137–141

Harrop SJ, DeMaere MZ, Fairlie WD, Reztsova T, Valenzuela SM, et al. 2001. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4- $^{\circ}$ A resolution. *J. Biol. Chem.* 276:44993–5000

Hayes DH, Flanagan JU, Jowsey IR (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol.* 45: 51-88.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445–600.

Hederos, S., Broo, K. S., Jakobsson, E., Kleywegt, G. J., Mannervik, B. & Baltzer, L. (2004). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 13163–13167.

Hegazy UM, Mannervik B, Stenberg G., 2004. Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase p1-1. *J Biol Chem.* 279(10):9586-96.

Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR. 1998. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5275–80

Hornby J., Codreanu S., Armstrong R., Dirr H. 2002: Molecular recognition at the dimer interface of a class mu glutathione transferase: role of a hydrophobic interaction motif in dimer stability and protein function. *Biochemistry* 48: 14238–14247.

Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hotchinson A, Perrson B (1999). Common structural features of MAPEG-A widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8(3): 689-692.

Jakobsson P-J, Mancini JA, Riendeau D, Ford-Hutchinson AW. 1997. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathionedependent transferase and peroxidase activities. *J. Biol. Chem.* 272:22934–39

Jeppesen MG, Ortiz P, Shepard W, Kinzy TG, Nyborg J, Andersen GR. 2003. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278:47190–98

Jepson I, Holt DC, Roussel V, Wright SY, Greenland AJ (1997) Transgenic plant analysis as a tool for the study of maize glutathione S-transferases. Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 313-323

Jowsey IR, Thomson RE, Orton TC, Elcombe CR, Hayes JD. 2003. Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 373:559–69

Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, et al. 1997. Cloning and crystal structure of haematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90:1085–95

Kanaoka Y, Maekawa A, Penrose JF, Austen KF, Lam BK. 2001. Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C4 synthase. *J. Biol. Chem.* 276:22608–13

Karavangeli M, Labrou NE, Clonis YD & Tsaftaris A (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol Eng* 22, 121-128.

Labrou NE, Karavangeli M, Tsaftaris A, Clonis YD. *Planta*. 2005 222(1):91-7.

Labrou NE, Rigden DJ, Clonis YD. *Biomol Eng*. 2004;21(2):61-6.

Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Armstrong RN. 2004. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* 43:352–61

Larsson AK, Emrén LO, Bardsley WG, Mannervik B. 2004. Directed enzyme evolution guided by multidimensional analysis of substrate-activity space. *Protein Eng Des Sel.* 17:49-55.

Light, G.G., Roxas, V.P., Mahan, J.R., Allen, R.D. 2005. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings that express a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance. *Planta.* 222(2):346-354.

Lim CEL, Matthaei KI, Blackburn AC, Davis RP, Dahlstrom JE, et al. 2004. Mice deficient in glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase exhibit a range of pathological changes and elevated expression of alpha, mu and pi class glutathione transferases. *Am. J. Pathol.* 165:379–93

Mandal AK, Skoch J, Bacskai BJ, Hyman BT, Christmas P, et al. 2004. The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6587–92

Martin, J.L.; Bardwell, J.C.A.; Kuriyan, J., 1993. “Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo.” *Nature* . v. 365 p. 464–468.

McGonigle B, Keeler SJ, Lau SMC, Koppe MK, Okeefe DPA (2000). Genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124(3): 1105-1120.

Milligan AS, Daly A, Parry MAJ, Lazzeri PA, Jepson I (2001) The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vitro. *Molecular Breeding* 7: 301-315

Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A. 2002. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the *hGSTA1* promoter. *Pharmacogenetics* 12:277–86

Nilsson LO, Gustafsson A, Mannervik B., 2000. Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97: 9408-12.

Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, Reddy CC. 2004. Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 424:72–80

Robinson A, Huttley GA, Booth HS, Board PG (2004). Modeling and bioinformatics studies of the human Kappa class glutathione transferase family with homology to prokaryotic 2-hydroxychromene- 2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* 379: 541-552.

Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D., 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant and cell physiology* 41, 1229-1234.

Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., Allen, R.D., 1997. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15, 988-991.

Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA, 1998 Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol.* 16:925–8.

Rui L, Kwon YM, Reardon KF, Wood TK, 2004. Metabolic pathway engineering to enhance aerobic degradation of chlorinated ethenes and to reduce their toxicity by cloning a novel glutathione S-transferase, an evolved toluene o-monooxygenase, and gamma-glutamylcysteine synthetase. *Environ Microbiol.* 6: 491-500.

Pettersson PL, Johansson AS, Mannervik B, 2002. "Transmutation of human glutathione transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase". *The Journal of biological chemistry*, 277:30019-22.

Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, De Toma G & Frova C (2004) Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics* 271, 511-521.

Thom R, Cummins I, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Laphorn AJ (2002). Structure of a Tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. Structure of a Tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry*, 41(22): 7008-7020.

Thom R, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Laphorn A (2001). The structure of a Zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterization of a GST with novel active site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* 308(5): 949- 962.

Thoren S, Weinander R, Saha S, Jegerschold C, Pettersson PL, et al. 2003. Human microsomal prostaglandin E synthase-1. Purification, functional characterization, and projection structure determination. *J. Biol. Chem.* 278:22199–209

Tobin MB, Gustafsson C, Huisman GW, 2000: Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol*, 10: 421-427.

Vuilleumier S., 1997. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol.* 179(5): 1431–1441.

Vuilleumier S, Pagni M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Feb;58(2):138–146.

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.

Wikteliu E., Stenberg G., 2007. Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem J.*; 406(1):115-23.

Xia B., Vlamis-Gardikas A., Holmgren A., Wright P.E., Dyson H.J., 2001. Solution structure of *E. coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian GSTs. *J. Mol. Biol.* 310, 907-918.

Yu H.J., Liu J.Q., Bock A., Li J., Luo G.M., Shen J.C., 2005. Engineering glutathione transferase to a novel glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. *J. Biol. Chem.* 280: 11930-11935.