

ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ε. Χρονοπούλου, Ν. Λάμπρου

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας

ΣΚΟΠΟΣ

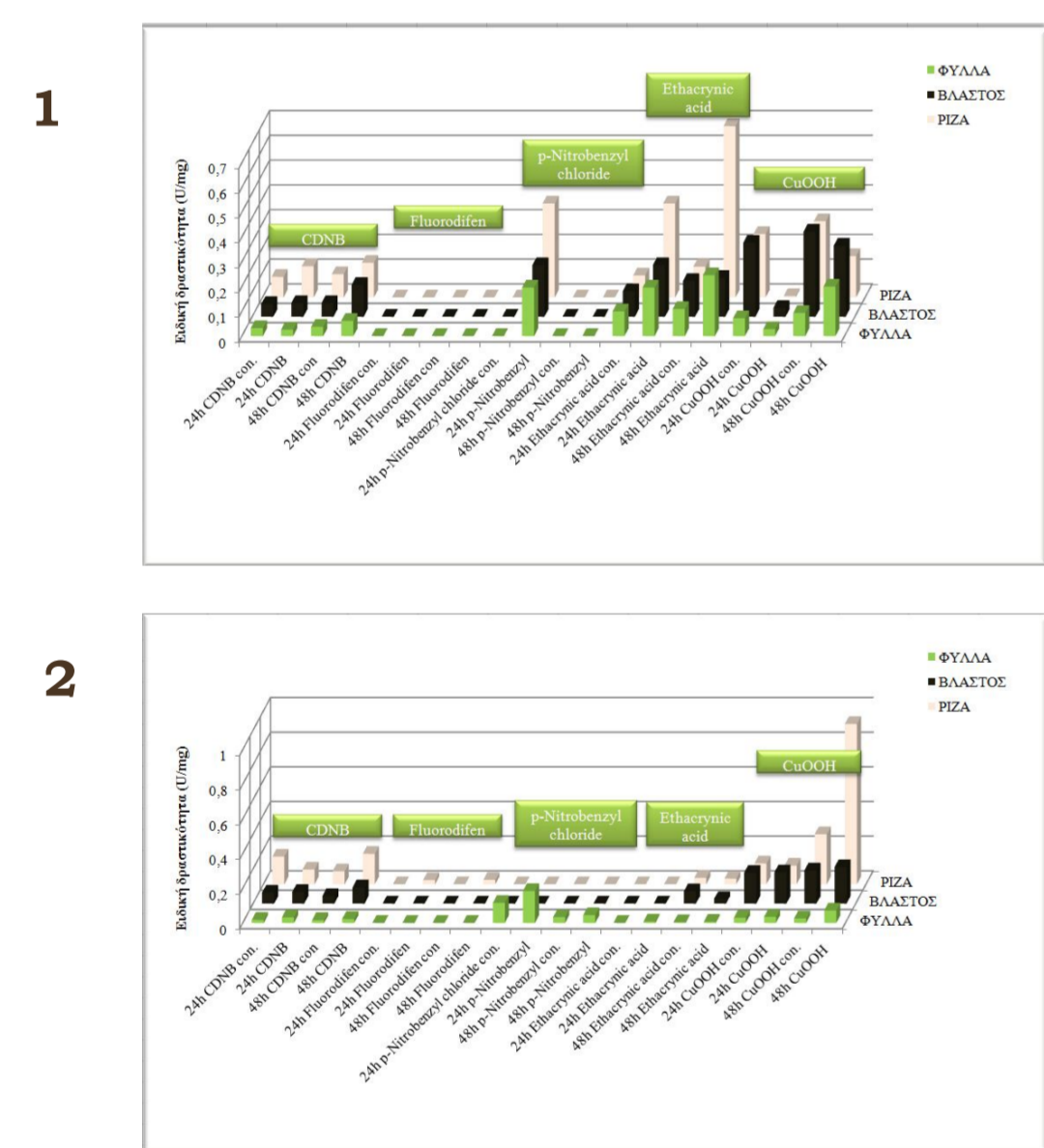
Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18) είναι ένζυμα τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά του σημαντικότερου μηχανισμού αποικοδόμησης και απομάκρυνσης τοξικών ουσιών από το κύτταρο. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη νέων και απλοποιημένων μεθόδων ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα, βασισμένων στο ένζυμο GST.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μελέτη GST δραστηριότητας εκχυλισμάτων από φυτά καταπονημένα και μη, των ειδών *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max*, ως προς πέντε υποστρώματα. Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης από τα καταπονημένα φυτά και *In vitro* ανασυναρμολόγηση των GST γονιδίων (DNA shuffling). Επιλογή του κατάλληλου κλώνου και ετερόλογη έκφραση του σε *E.coli*. Καθαρισμός με χρωματογραφία, κινητική ανάλυση, μελέτη ειδικής δραστηριότητας ως προς 20 υποστρώματα και ενζυμικής αναστολής ως προς 65 φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Ακολούθησε κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση του νέου κλώνου στη θέση Phe117, κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων, έκφραση και καθαρισμός των ενζύμων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για κάθε μεταλλαγμένο κλώνο και σάρωση ως προς 20 φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

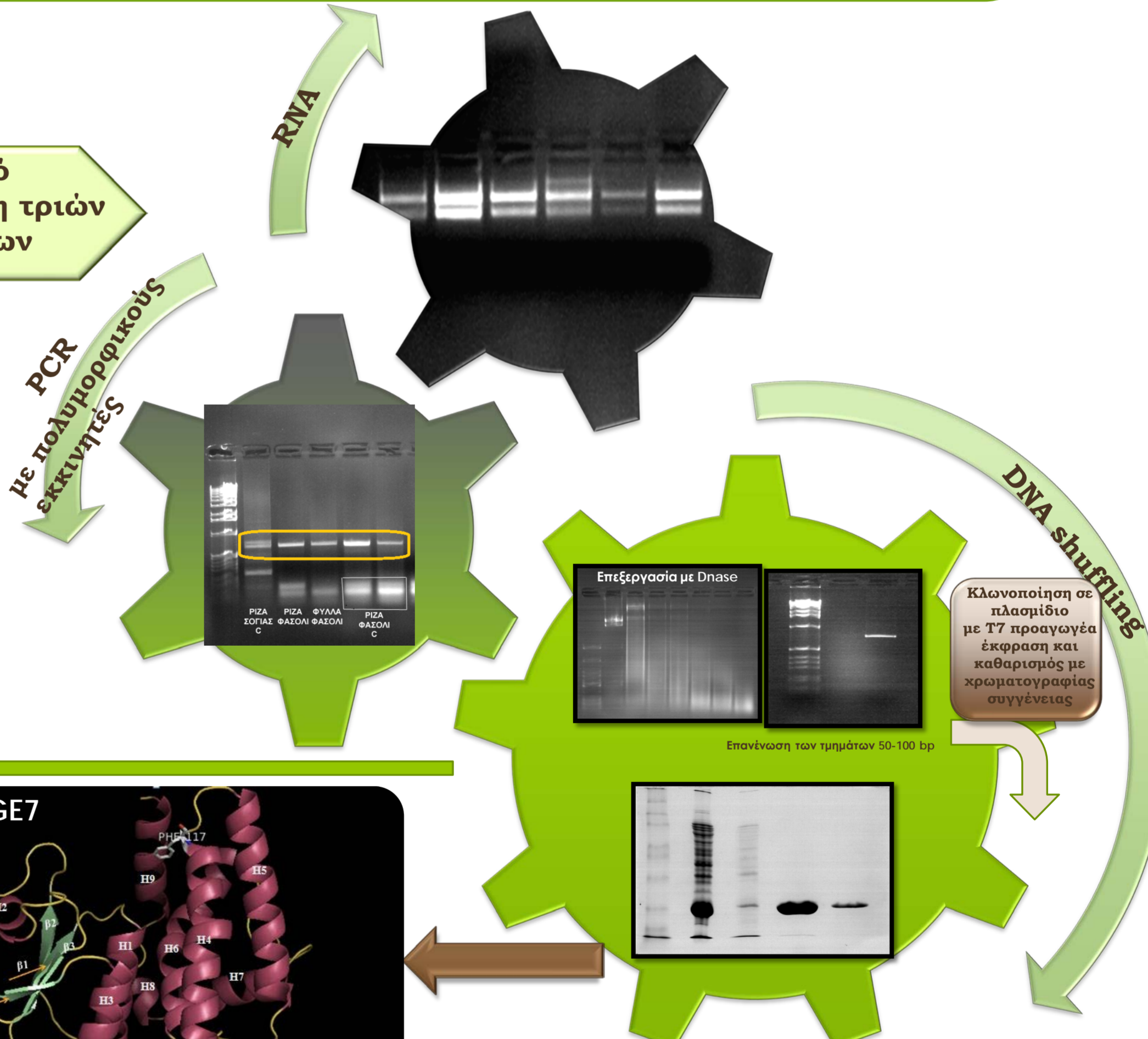
Δημιουργήθηκε cDNA βιβλιοθήκη από τα καταπονημένα φυτά *Phaseolus vulgaris* και *Glycine max* χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκφυλισμένους εκκινητές και αντίστροφη μεταγραφή-PCR. Τα GST γονίδια υποβλήθηκαν σε *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη. Η βιβλιοθήκη χιμαιρικών GST γονιδίων που προέκυψε κλωνοποιήθηκε σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε *E. coli*. Σάρωση της βιβλιοθήκης οδήγησε στην επιλογή μιας νέας μορφής GST ενζύμου. Η μορφή αυτή εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή δράση μεταφοράς και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Μελετώντας 65 διαφορετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα βρέθηκαν κυρίως οι ομάδες των στρομπιλουρινών και οξαζολιδινονών μυκητοκτόνων, καθώς και τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα να είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου.



Εικ.1. Μελέτη εκχυλισμάτων από τα φυτά *Glycine max* (1) και *Phaseolus vulgaris* (2) ως προς 5 υποστρώματα.

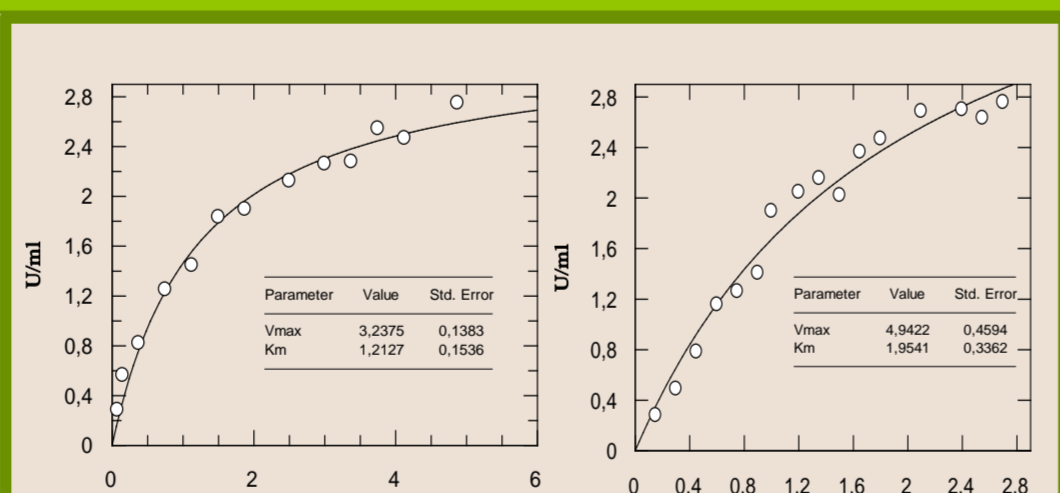


Μετά από ανάπτυξη τριών εβδομάδων

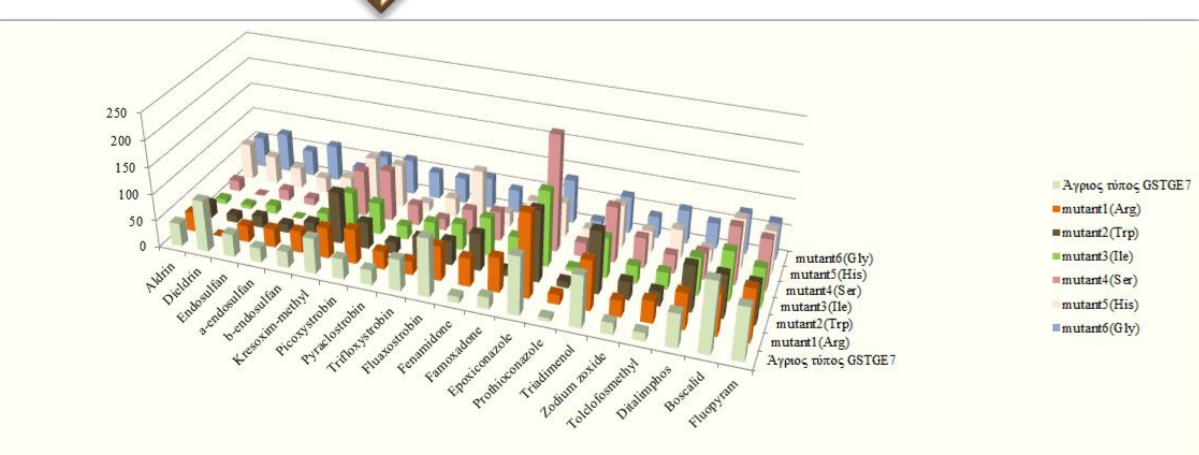


Ακολουθήσε μετάλλαξη του αμινοξέος Phe117

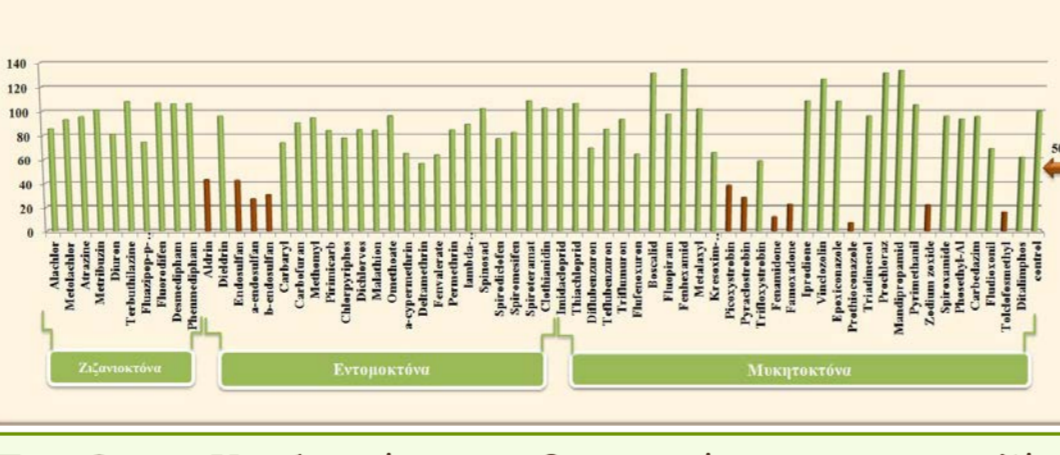
Arg
His
Ser
Gly
Trp
Thr
Ile



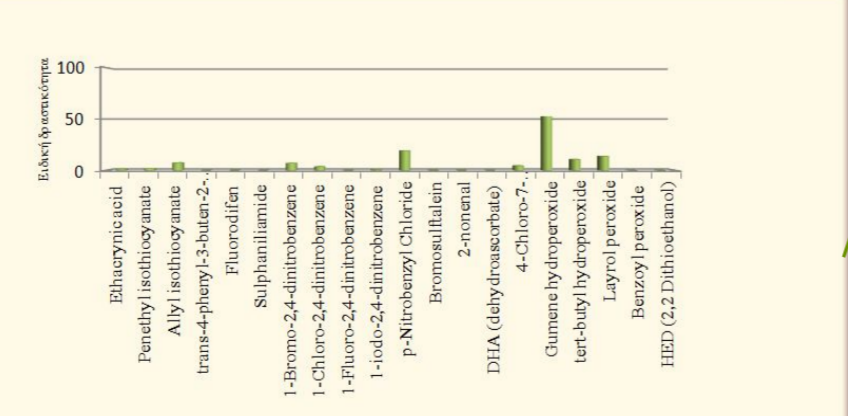
Εικ.2. Κινητική ανάλυση του κλώνου GSTGE7 με το σύστημα GSH-CDNB



Εικ.5. Οι νέοι κλώνοι φαίνονται να αναστέλλονται περισσότερο από τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και κυρίως ο κλώνος με τη μετάλλαξη Phe117Ile



Εικ.3. Υπολειπόμενη δραστηριότητα του ενζύμου GSTGE7 έναντι φυτοπροστατευτικών προϊόντων



Εικ.4. Μελέτη του ενζύμου GSTGE7 ως προς 20 πιθανά υποστρώματα

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Μέθοδοι όπως η *In vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη και μεταλλαξογένεση μπορούν να οδηγήσουν σε πιο δραστικούς φυτικούς κλώνους GSTs και μεγαλύτερης εκλεκτικότητας σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Συνεπώς μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη απλών τεχνικών ανάλυσης υπολειμματικότητας τοξικών ουσιών σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα και στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
E.G. Chronopoulou A.C. Papageorgiou, A. Markoglou, N.E. Labrou, Mol Cat 81: (2012) 43-51.
J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45 (2005) 51-88.
Y. Sayed, J.H. Hensley, M. Lopez, H. Dirr, Biochemistry 363 (2002) 341-346.
M. Karavangelis, N.E. Labrou, Y.D. Clonis, A. Tsiftaris, Biotechnol. Bioeng. 22: (2005)121-128.



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.