

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

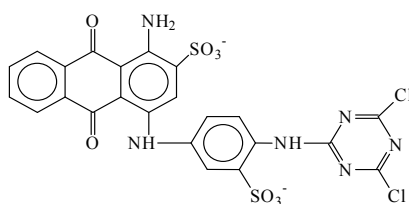


A. Διδακτορική Διατριβή

Τίτλος: Ανθρακινονικές καρβοξυλο-βιομιμητικές χρωστικές και εφαρμογή τους στη μοριακή μελέτη και τον καθαρισμό ενζύμων.

Οι δραστικές τριαζινο-χρωστικές χρησιμοποιούνται συχνά σε τεχνικές που βασίζονται στην αρχή της βιολογικής συγγένειας εξαιτίας του χαμηλού τους κόστους. Οι εμπορικά διαθέσιμες χρωστικές εμφανίζουν μικρή εκλεκτικότητα κατά την αλληλεπίδραση με ένζυμα. Για να βελτιωθεί η εκλεκτικότητά τους έγινε προσπάθεια σχεδιασμού και σύνθεσης νέων τροποποιημένων χρωστικών (βιομιμητικές χρωστικές) κατά τρόπο ώστε να μιμούνται τα φυσιολογικά υποστρώματα ή αναστολείς των ενζύμων.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε η ιδέα των χιμαιρικών (δिलειτουργικών) βιομιμητικών χρωστικών και μελετήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η εφαρμογή τους. Οι χρωστικές αυτές προέρχονται από την χρωστική Vilmafix blue A-R με αντικατάσταση του ενός χλωρίου του διχλωροτριαζινικού δακτυλίου με (κετο)καρβοξυλικά οξέα διαφορετικού μεγέθους και πολικότητας. Οι χρωστικές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να έχουν δύο περιοχές αναγνώρισης από τα ένζυμα: (i) το ανθρακινονικό χρωμοφόρο, το οποίο αναγνωρίζεται από τα ένζυμα σαν νουκλεοτιδικό ψευδοανάλογο και (ii) τον τελικό (κετο)καρβοξυλικό υποκαταστάτη, ο οποίος αναγνωρίζεται από τα ένζυμα που δεσμεύουν (κετο)καρβοξυλικά οξέα σαν ανάλογο του υποστρώματός τους.



Η χρωστική Vilmafix blue A-R.

Σαν μοντέλα μελέτης επιλέχθηκαν τα ένζυμα: μυρμηκική αφυδρογονάση, L-μηλική αφυδρογονάση και οξαλοξική αποκαρβοξυλάση. Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν διαφορετική δομή, μηχανισμό και εξειδίκευση, αλλά έχουν την κοινή ιδιότητα να αναγνωρίζουν σαν υπόστρωμά τους (κετο)καρβοξυλικά οξέα και νουκλεοτιδικά παράγωγα.

Αρχικά μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των βιομιμητικών χρωστικών με τα ένζυμα εφαρμόζοντας κινητικές (αντιστρεπτής και μη-αντιστρεπτής ενζυμικής αναστολής) και φασματοσκοπικές (difference spectral titrations). Τα συμπεράσματα ήταν τα ακόλουθα:

α) Οι δραστικές χρωστικές δεσμεύονται εκλεκτικά στην περιοχή δέσμευσης των υποστρωμάτων των ενζύμων.

β) Οι (κετο)καρβοξυλικές βιομιμητικές χρωστικές, συγκριτικά με τις μη-βιομιμητικές (Vilmafix blue A-R και Cibacron blue 3GA), εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια με τα ένζυμα.

γ) Τα ένζυμα αναγνωρίζουν και διακρίνουν δύο περιοχές στις βιομιμητικές χρωστικές: το ανθρακινονικό χρωμοφόρο, σαν νουκλεοτιδικό ανάλογο και τον τελικό υποκαταστάτη σαν ανάλογο του υποστρώματός τους.

Ακολούθως, οι βιομιμητικές και μη-βιομιμητικές χρωστικές (Vilmafix blue A-R και Cibacron blue 3GA) ακινητοποιήθηκαν σε αгарόζη (Ultrogel A6R) και εκτιμήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των αντίστοιχων προσροφητών. Οι βιομιμητικοί προσροφητές εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού των ενζύμων από τους μη-βιομιμητικούς. Συγκεκριμένα, ο προσροφητής με (κετο)καρβοξυλικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση από *Candida boidinii*, ενώ ο προσροφητής με υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ, χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου L-μηλική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου. Οι καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ένα χρωματογραφικό στάδιο (3,9 φορές καθαρισμός, ειδική δραστηριότητα 7,0 units/mg και 60% ανάκτηση για τη μυρμηκική

αφυδρογονάση και 27 φορές καθαρισμός, ειδική δραστηριότητα 1.300 units/mg, 54% ανάκτηση για την L-μηλική αφυδρογονάση), λαμβάνοντας ένζυμο υψηλής καθαρότητας, κατάλληλα για αναλυτικές εφαρμογές.

Τέλος έγινε εφαρμογή των βιομημητικών προσροφητών στον καθαρισμό ενζύμου από καινούργια πηγή. Η εφαρμογή αφορά το ένζυμο L-μηλική αφυδρογονάση από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri*. Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε δύο χρωματογραφικά στάδια (82 φορές καθαρισμός και 48% ανάκτηση) χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής και χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή με βιομημητικό υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ. Το καθαρό ένζυμο χαρακτηρίστηκε και μελετήθηκε δομικά και κινητικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η L-μηλική αφυδρογονάση από *P. stutzeri* εμφανίζει κατά ~100 % υψηλότερη δραστηριότητα από αυτή των εμπορικών παρασκευασμάτων από θηλαστικά. Η υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου σε συνδυασμό με τις ευνοϊκές θερμοδυναμικές του ιδιότητες, την υψηλή του σταθερότητα και την ευκολία καθαρισμού του, καθιστούν το ένζυμο L-μηλική αφυδρογονάση από *Pseudomonas stutzeri* υψηλής ποιότητας βιοκαταλύτη για εφαρμογές στην αναλυτική βιοτεχνολογία.

B. Ερευνητικές δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά που περιλαμβάνονται στο Science

Citation Index με κριτές.

B1. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1994). The affinity technology in downstream processing. *J. Biotechnol.*, 36, 95-119.

Στο άρθρο γίνεται ανασκόπηση των εφαρμογών της βιολογικής αναγνώρισης/συγγένειας στην ανάπτυξη μεθόδων και διεργασιών καθαρισμού ενζύμων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Γίνεται

παρουσίαση των σημαντικότερων δεσμευτών υψηλής και χαμηλής εκλεκτικότητας και περιγράφεται η εφαρμογή τους σε χρωματογραφικές και μη-χρωματογραφικές τεχνικές.

B2. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1995). The interaction of *Candida boidinii* formate dehydrogenase with a new family of chimeric biomimetic dye-ligands. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 169-178.

Με την εργασία αυτή γίνεται εισαγωγή της ιδέας των (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικών χρωστικών. Εξηγείται ο σχεδιασμός τους και περιγράφεται η σύνθεση και ο καθαρισμός τους σε στήλη Sephadex LH-20. Οι χρωστικές αυτές προέρχονται από τη μη-βιομιμητική χρωστική Vilmafix blue A-R με αντικατάσταση του ενός χλωρίου του διχλωροτριαζινικού δακτυλίου με (κετο)καρβοξυλικά οξέα διαφορετικού μεγέθους και πολικότητας. Μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των χρωστικών με το ένζυμο μυρμηκική αφυδρογονάση χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές (difference spectral titrations) και κινητικές μεθόδους αντιστρεπτής και μη-αντιστρεπτής ενζυμικής αναστολής. Η μελέτη έδειξε ότι η χρωστική Vilmafix blue A-R αλληλεπιδρά μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο ($k_3 = 0,19 \text{ min}^{-1}$, $K_D = 19,3 \text{ }\mu\text{M}$). Οι βιομιμητικές χρωστικές αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά και εμφανίζουν σημαντικά μικρότερες σταθερές διάστασης (K_D) συγκριτικά με τις μη-βιομιμητικές. Ειδικότερα, η χρωστική με τελικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το μ-αμινοβενζοϊκό οξύ εμφανίζει κατά 8-φορές υψηλότερη συγγένεια με το ένζυμο ($K_D = 1,6 \text{ }\mu\text{M}$) συγκριτικά με τη μη-βιομιμητική Cibacron blue 3GA. Κινητική ανάλυση έδειξε ότι το ένζυμο αναγνωρίζει και διακρίνει τα δύο λειτουργικά τμήματα της χρωστικής: το ανθρακινονικό χρωμοφόρο σαν ανταγωνιστικό αναστολέα του NAD^+ ($K_i = 15,6 \text{ }\mu\text{M}$) και το (κετο)καρβοξυλικό άκρο σαν συναγωνιστικό αναστολέα του μυρμηκικού οξέος ($K_i = 15,6 \text{ }\mu\text{M}$). Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή μελετήθηκε η συμπεριφορά και αποδείχτηκε η αποτελεσματικότητα των (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικών χρωστικών. Τα

αποτελέσματα έθεσαν τη βάση για περαιτέρω εφαρμογή των βιομιμητικών χρωστικών και σε άλλα ένζυμα που να αναγνωρίζουν (κετο)καρβοξυλικά οξέα.

B3. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1995). Oxaloacetate decarboxylase: on the mode of interaction with substrate-mimetic affinity ligands. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 61-70.

Στην εργασία αυτή γίνεται μελέτη της αλληλεπίδρασης των (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικών χρωστικών με το ένζυμο οξαλοξική αποκαρβοξυλάση χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές (difference spectral titrations) και κινητικές μεθόδους αντιστρεπτής και μη-αντιστρεπτής ενζυμικής αναστολής. Η μελέτη έδειξε ότι η μη-βιομιμητική χρωστική Vilmafix blue A-R αλληλεπιδρά μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο ($k_3 = 0,22 \text{ min}^{-1}$, $K_D = 67,2 \text{ }\mu\text{M}$). Οι βιομιμητικές χρωστικές αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά και εμφανίζουν σημαντικά μικρότερες σταθερές διάστασης (K_D) συγκριτικά με τις μη-βιομιμητικές. Ειδικότερα, η χρωστική με τελικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το αμινοαιθυλοξαμικό οξύ εμφανίζει κατά 10-φορές υψηλότερη συγγένεια με το ένζυμο ($K_D = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$) συγκριτικά με τη μη-βιομιμητική Cibacron blue 3GA. Κινητική ανάλυση έδειξε ότι οι χρωστικές συμπεριφέροντε σαν συναγωνιστικοί αναστολείς έναντι του οξαλοξικού οξέος ($K_i = 98 \text{ }\mu\text{M}$). Σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα της αλληλεπίδρασης ενζύμου-χρωστικής παίζει το μεταλλικό ιόν Mn^{+2} , το οποίο συμπεριφέρεται σαν μερικώς-συναγωνιστικός ενεργοποιητής του ενζύμου.

B4. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1995). Biomimetic affinity ligands for oxalate-recognizing enzymes. Studies with oxalate oxidase and oxalate decarboxylase. *J. Biotechnol.*, 40, 59-70.

Για να μελετηθεί περαιτέρω η λειτουργία των (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικών χρωστικών, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με δύο ένζυμα διαφορετικού

μηχανισμού και εξειδίκευσης, αλλά με κοινό υπόστρωμα: την οξειδάση και αποκαρβοξυλάση του οξαλικού οξέος. Έγινε φασματοσκοπική (difference spectral titrations) και κινητική μελέτη (αντιστρεπτή ενζυμική αναστολή) της αλληλεπίδρασης και υπολογίστηκαν οι σταθερές διάστασης των συμπλόκων ενζύμων-χρωστικών. Οι βιομιμητικές χρωστικές με τελικό υποκαταστάτη το μ-αμινοβενζοϊκό οξύ και το μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ εμφάνισαν υψηλότερη συγγένεια με την οξειδάση και αποκαρβοξυλάση του οξαλικού οξέος, αντίστοιχα. Φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι οι χρωστικές αλληλεπιδρούν κατά διαφορετικό τρόπο με κάθε ένζυμο. Ειδικότερα, με την οξειδάση του οξαλικού οξέος αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες δυνάμεις και συμπεριφέροντε ως μη-γραμμικοί αναστολείς μικτού τύπου έναντι του οξαλικού οξέος ($K_i = 5,1 \mu\text{M}$). Στην περίπτωση της αποκαρβοξυλάσης του οξαλικού οξέος, οι χρωστικές αλληλεπιδρούν με το ένζυμο με δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως και κινητικά συμπεριφέροντε ως συναγωνιστικοί αναστολείς έναντι του οξαλικού οξέος ($K_i = 25,4 \mu\text{M}$).

B5. N.E. Labrou, A. Karagouni and Y.D. Clonis (1995). Biomimetic-dye affinity adsorbents for enzyme purification: application to the one-step purification of of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biotech. Bioeng.*, 48, 278-288.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η σύνθεση και εφαρμογή προσροφητών με ακινητοποιημένες (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικές και μη-βιομιμητικές χρωστικές. Μελετήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών ακινητοποίησης σε αгарόζη (Ultrogel A6R) και πραγματοποιήθηκε συγκριτική εκτίμηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των βιομιμητικών έναντι των μη-βιομιμητικών προσροφητών στον καθαρισμό του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση από *Candida boidinii*.

Κινητική μελέτη έδειξε ότι η προσρόφηση του ενζύμου είναι εκλεκτική και ακολουθεί το πρότυπο της ισοθέρμου του Langmuir ($K_D = 0,05 \mu\text{M}$). Οι βιομιμητικοί προσροφητές εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού (~30%) του ενζύμου, έναντι των μη-βιομιμητικών (Vilmafix

Blue A-R-Ultrogel A6R και Cibacron Blue 3GA-Ultrogel A6R). Συγκεκριμένα, ο προσροφητής με (κετο)καρβοξυλικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ εμφάνισε την υψηλότερη εκλεκτικότητα έναντι του ενζύμου και χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό του καθαρισμό σε ένα στάδιο. Η μέθοδος (3,9-φορές καθαρισμός, ειδική δραστηριότητα 7,0 units/mg και 60% ανάκτηση) έδωσε ομοιογενές ένζυμο, υψηλότερης καθαρότητας από το αντίστοιχο εμπορικό αναλυτικής καθαρότητας (SDS-PAGE ανάλυση). Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή αποδείχτηκε η υπεροχή των βιομιμητικών προσροφητών έναντι των μη-βιομιμητικών και αποτέλεσε την αφετηρία άλλων εργασιών με σκοπό να αποδειχθεί η δυνατότητα της ευρύτερης εφαρμογής τους στον καθαρισμό ενζύμων που αναγνωρίζουν (κετο)καρβοξυλικά οξέα.

B6. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1995). Biomimetic-dye affinity chromatography for the purification of bovine heart L-lactate dehydrogenase. *J. Chromatogr. A*, 718, 35-44.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η εφαρμογή των (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικών προσροφητών στο χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου L-γαλακτική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου καθώς επίσης και η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της ακινητοποιημένης χρωστικής στη χωρητικότητα, εκλεκτικότητα και καθαριστική ικανότητα των προσροφητών. Οι βιομιμητικοί προσροφητές εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού του ενζύμου, συγκριτικά με τους μη-βιομιμητικούς (Vilmafix Blue A-R-Ultrogel A6R και Cibacron blue 3GA-Ultrogel A6R). Ειδικότερα, ο προσροφητής με (κετο)καρβοξυλικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ εμφάνισε την υψηλότερη εκλεκτικότητα έναντι του ενζύμου και χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό του καθαρισμό σε δύο στάδια (πρώτο στάδιο χρωματογραφία συγγένειας στο βιομιμητικό προσροφητή και δεύτερο στάδιο χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής). Η μέθοδος (35,6-φορές καθαρισμός, ειδική δραστηριότητα 481 units/mg και 50% ανάκτηση) έδωσε ένζυμο υψηλότερης καθαρότητας από το αντίστοιχο εμπορικό αναλυτικής

καθαρότητας (SDS-PAGE ανάλυση). Η μέθοδος καθαρισμού του ενζύμου που αναπτύχθηκε κρίθηκε ως μια από τις αποδοτικότερες από πλευράς κόστους/ποιότητας τελικού προϊόντος που έχει δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

B7. N.E. Labrou E. Eliopoulos and Y.D. Clonis (1996). Dye-affinity labelling of bovine heart mitochondrial malate dehydrogenase and study of the NADH-binding site. *Biochem. J.*, 315, 687-693.

Σκοπός της εργασίας ήταν η εφαρμογή της δραστικής διχλωροτριαζινικής χρωστικής Vilmafix blue A-R στη σήμανση συγγένειας του ενζύμου L-μηλική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου, με σκοπό τον ακριβή εντοπισμό της θέσης που δεσμεύεται στο ένζυμο. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μεθόδων πρωτεϊνικής χημείας και βιοϋπολογιστικής (μοριακή προσομοίωση). Η μελέτη έδειξε ότι η χρωστική αλληλεπιδρά εκλεκτικά και μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο ($k_3 = 0,16 \text{ min}^{-1}$, $K_D = 14,4 \mu\text{M}$). Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης του χλωρίου του τριαζινικού δακτυλίου της χρωστικής από κάποια δραστική πλευρική ομάδα αμινοξέος του πρωτεϊνικού μορίου. Πρωτεολυτική πέψη με θρυψίνη, όξινη υδρόλυση και αμινοξική ανάλυση με HPLC, του τροποποιημένου με τη χρωστική ενζύμου, έδειξε ότι το τροποποιημένο αμινοξύ είναι Lys. Κατασκευή του δομικού μοντέλου του ενζύμου και του μοντέλου της χρωστικής και προσομοίωση της αλληλεπίδρασης ενζύμου-χρωστικής με βιοϋπολογιστικές μεθόδους, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το δραστικό αμινοξύ είναι η Lys-81 ή/και Lys-217. Τα αποτελέσματα αυτά βρήκαν εφαρμογή στην επόμενη εργασία και αποτέλεσαν τη θεωρητική βάση για την εφαρμογή βιοϋπολογιστικών μεθόδων στη μελέτη της αλληλεπίδρασης ενζύμων-ανθρακινονικών χρωστικών.

B8. N.E. Labrou E. Eliopoulos and Y.D. Clonis (1996). Molecular modeling for the design of dye-ligands and their interaction with mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 315, 695-703.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης των (κετο)καρβοξυλοβιομιμητικών χρωστικών με το ένζυμο L-μηλική αφυδρογονάση χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές (difference spectral titrations), κινητικές (αντιστρεπτή και μη-αντιστρεπτή ενζυμική αναστολή) και βιοϋπολογιστικές μεθόδους (μοριακή προσομοίωση). Η εφαρμογή των θεωρητικών βιοϋπολογιστικών μεθόδων έδωσε με αξιοσημείωτη ακρίβεια ερμηνεία στα πειραματικά αποτελέσματα της φασματοσκοπικής και κινητικής μελέτης. Η εργασία έθεσε τη βάση του ορθολογιστικού σχεδιασμού βιομιμητικών χρωστικών και αποτέλεσε την αφετηρία μελλοντικών εφαρμογών της μεθοδολογίας στο σχεδιασμό άλλων βιομιμητικών χρωστικών για ένζυμα διαφορετικής δομής και εξειδίκευσης (εργασία B11).

B9. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1996). Biomimetic-dye affinity chromatography for the purification of mitochondrial L-malate dehydrogenase from bovine heart. *J. Biotechnol.*, 45, 185-194.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η εφαρμογή των (κετο)καρβοξυλοβιομιμητικών προσροφητών στο χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου L-μηλική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου. Οι βιομιμητικοί προσροφητές εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού του ενζύμου, συγκριτικά με τους μη-βιομιμητικούς (Vilmafix Blue A-R-Ultrogel A6R και Cibacron blue 3GA-Ultrogel A6R). Συγκεκριμένα, ο προσροφητής με (κετο)καρβοξυλικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ εμφάνισε την υψηλότερη εκλεκτικότητα έναντι του ενζύμου και χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό του καθαρισμό σε ένα στάδιο. Η μέθοδος (27-φορές

καθαρισμός, ειδική δραστικότητα 1313 units/mg και 54% ανάκτηση) έδωσε ένζυμο υψηλότερης καθαρότητας από το αντίστοιχο εμπορικό αναλυτικής καθαρότητας (SDS-PAGE ανάλυση). Η μέθοδος καθαρισμού του ενζύμου που αναπτύχθηκε κρίθηκε ως η αποδοτικότερη από πλευράς κόστους/ποιότητας τελικού προϊόντος που έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

B10. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1997). Simultaneous separation and purification of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase from bovine heart. *Bioprocess Engineering*, 16, 157-161.

Στην παρούσα εργασία έγινε συνδυασμός των δύο μεθόδων καθαρισμού των ενζύμων L-μηλική και L-γαλακτική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου, που έχουν παρουσιαστεί στις εργασίες B5 και B8, σε ένα ενιαίο τροποποιημένο πρωτόκολλο με σκοπό τη μείωση του κόστους της διεργασίας. Η διεργασία στηρίζεται σε συνδυασμό χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής και συγγένειας. Η χρωματογραφία συγγένειας πραγματοποιήθηκε στο βιομημητικό προσροφητή με βιομημητικό υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ. Η εργασία αποτέλεσε παράδειγμα αποτελεσματικής εφαρμογής των βιομημητικών προσροφητών σε ταχείες διεργασίες ταυτόχρονου καθαρισμού πολλών ενζύμων.

B11. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1997). L-malate dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri*: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 337, 103-114.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται ο καθαρισμός και χαρακτηρισμός του ενζύμου L-μηλική αφυδρογονάση από *Pseudomonas stutzeri*. Λόγω των σημαντικών εφαρμογών του ενζύμου τόσο στην αναλυτική βιοχημεία, (για τον προσδιορισμό του οξαλοξικού/L-μηλικού οξέος σε βιολογικά δείγματα) όσο και στη συνθετική χημεία (για την ενζυμική σύνθεση οξαλοξικού οξέος) έγινε

προσπάθεια καθαρισμού του ενζύμου από το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri*, αφού αρχικές πειραματικές ενδείξεις έδειξαν ότι το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένες κινητικές ιδιότητες. Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Σε πρώτο στάδιο εφαρμόστηκε χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (30,5-φορές καθαρισμός, ειδική δραστικότητα 915 units/mg και 53% ανάκτηση) και σε δεύτερο στάδιο χρωματογραφία συγγένειας (2,7-φορές καθαρισμός, ειδική δραστικότητα 2.460 units/mg και 90% ανάκτηση). Το καθαρό ένζυμο μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε δομικά και κινητικά (μοριακό βάρος, αριθμός και οργάνωση υπομονάδων, χημική τροποποίηση της δομής του ενζύμου, προσδιορισμός κινητικών σταθερών, πρόβλεψη του μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης, μελέτη της ενζυμικής σταθερότητας έναντι χημικών παραγόντων και θερμοκρασίας). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το ένζυμο πλεονεκτεί σε δραστικότητα (~100 % μεγαλύτερη) έναντι αυτής των εμπορικών παρασκευασμάτων από πηγές θηλαστικών. Η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου (2.460 units/mg) σε συνδυασμό με τις ευνοϊκές θερμοδυναμικές του ιδιότητες, την υψηλή του σταθερότητα και την ευκολία καθαρισμού, καθιστούν το ένζυμο από *Pseudomonas stutzeri* υψηλής ποιότητας βιοκαταλύτη για εφαρμογές στην αναλυτική βιοτεχνολογία.

B12. N.E. Labrou, E. Eliopoulos and Y.D. Clonis (1999). Molecular Modeling for the Design of a Biomimetic Chimeric Ligand. Application to the Purification of Bovine Heart L-Lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 322-332.

Εφαρμόστηκαν τεχνικές μοριακής μοντελοποίησης για το σχεδιασμό νέας βιομιμητικής χρωστικής για το ένζυμο L-γαλακτική αφυδρογονάση από καρδιά μόσχου. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλοκο χρωστικής-L-γαλακτικής αφυδρογονάσης έδειξε ότι η δομή του βέλτιστου βιομιμητικού υποκαταστάτη είναι το 2-(4-αμινοφαινυλ)-αιθυλοξαμικό οξύ. Ο υποκαταστάτης αυτός επιτρέπει την ανάπτυξη των βέλτιστων ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων

αλληλεπιδράσεων με το ένζυμο. Η βιομιμητική χρωστική ακινητοποιήθηκε σε αγαρόζη (Ultrogel A6R) και εκτιμήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά του προσροφητή στον καθαρισμό του ενζύμου. Ο βιομιμητικός προσροφητής εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού του ενζύμου, συγκριτικά με τους μη-βιομιμητικούς, τόσο από την καρδιά μόσχου όσο και από άλλα βιολογικά εκχυλίσματα (π.χ. από ήπαρ, πάγκρεας κ.α.), δείχνοντας έτσι τη δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής του προσροφητή. Αναπτύχθηκε βελτιωμένο πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με συνδυασμό χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής και χρωματογραφίας συγγένειας. Συνολικά η μέθοδος απέδωσε 44,4-φορές καθαρισμό, ειδική δραστικότητα 600 units/mg και 56% ανάκτηση. Το ενζυμικό παρασκεύασμα ήταν ομοιογενές με SDS-PAGE ανάλυση.

B13. N.E. Labrou, L.V. Mello, D.J. Rigden, J.N. Keen & J.B.C. Findlay (1999). Structure-activity studies on cysteine-substituted neurokinin A analogs. *Peptides*, 20, (7), 795-801.

Στην εργασία αυτή έγινε σύνθεση υποκατεστημένων με L-Cys πεπτιδικών αναλόγων της νευροκινίνης Α (NKA) και μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με τον ανασυνδυασμένο υποδοχέα νευροκινίνη-2 (NK2), ετερόλογα εκφρασμένο σε κύτταρα *S. frugiperda*. Η μελέτη έδειξε ότι το ανάλογο [Cys⁶]-NKA εμφανίζει πλήρη απώλεια της δράσης του, ενώ τα ανάλογα με υποκατεστημένα τα αμινοξέα στο C-τελικό άκρο (Met¹⁰, Leu⁹, Gly⁸, Val⁷, Asp⁴) αλληλεπιδρούν με μειωμένη συγγένεια κατά 23 με 250-φορές. Επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη της μοριακής δυναμικής των πεπτιδικών αναλόγων με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση των υποκαταστάσεων στη δομή και ευελιξία του πεπτιδίου. Η ανάλυση έδειξε ότι η αλλαγή των δυναμικών ιδιοτήτων των πεπτιδίων, που προκλήθηκε από τις κυστεΐνυλ-υποκαταστάσεις, δεν ευθύνονται για την μειωμένη συγγένεια με τον υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν σε πρόβλεψη της πιθανής βιοδραστικής διαμόρφωσης της δομής της νευροκινίνης Α, καθώς και σε πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων πεπτιδίου-υποδοχέα.

B14. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1999). Oxaloacetate decarboxylase from *Pseudomonas stutzeri*: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365, 17-24.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται ο καθαρισμός και χαρακτηρισμός του ενζύμου οξαλοξική αποκαρβοξυλάση από *Pseudomonas stutzeri*. Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Σε πρώτο στάδιο εφαρμόστηκε χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, σε δεύτερο στάδιο χρωματογραφία συγγένειας σε μεταλλοχηλικό προσροφητή και τέλος χρωματογραφία συγγένειας σε βιομιμητικό προσροφητή με (κετο)καρβοξυλικό βιομιμητικό υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοβενζοϊκό οξύ. Συνολικά το ένζυμο καθαρίστηκε 245-φορές, σε ειδική δραστηριότητα 319 units/mg και 31% ανάκτηση. Στο καθαρό ένζυμο έγινε λεπτομερής κινητική μελέτη (προσδιορισμός κινητικών σταθερών, πρόβλεψη του μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης, μελέτη της ενζυμικής σταθερότητας έναντι χημικών παραγόντων).

B15. N.E. Labrou (1999). Affinity labeling of oxaloacetate decarboxylase by novel dichlorotriazine linked α -ketoacids. *J. Prot. Chem.*, 18, 729-733.

Στην εργασία αυτή έγινε σχεδιασμός, σύνθεση και μελέτη δύο εκλεκτικών και μη-αντιστρεπτών αναστολέων του ενζύμου οξαλοξική αποκαρβοξυλάση από *Pseudomonas stutzeri*. Οι αναστολείς αυτοί (διχλωροτριαζινυλ-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ και διχλωροτριαζινυλ-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ) σχεδιάστηκαν ώστε να αποτελούνται από ένα δραστικό ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (χλωροτριαζινικός δακτύλιος) και από ένα βιομιμητικό κέντρο (καρβοξυλικό οξύ) που να μιμείται το υπόστρωμα του ενζύμου (οξαλοξικό οξύ). Κατά την επώαση του ενζύμου με τους αναστολείς αυτούς παρατηρήθηκε εκλεκτική και μη-αντιστρεπτή αδρανοποίηση του ($k_3 = 0,013 \text{ min}^{-1}$, $K_D = 20,3 \text{ }\mu\text{M}$, για τον βέλτιστο αναστολέα

διχλωροτριαζινυλ-αμινοφαινυλοξανυλικό οξύ). Επιπλέον, μελετήθηκε κινητικά η αλληλεπίδραση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά του σημαντή συγγένειας έναντι του ενζύμου οξαλοξική αποκαρβοξυλάση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω *in vivo* και *in vitro* μελέτες.

B16. N.E. Labrou (2000). Improved Purification of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase. *Bioseparation*, 9, 99-104.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται τροποποιημένη μέθοδος καθαρισμού του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση βασιζόμενη όχι σε βιομημητικά υλικά (εργασία B4) αλλά σε εμπορικά διαθέσιμα χρωματογραφικά υλικά. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής και χρωματογραφίας συγγένειας στον προσροφητή Cibacron Blue 3GA-Sepharose (4-φορές καθαρισμός, ειδική δραστηριότητα 7.2 units/mg και 60% ανάκτηση) και έδωσε ομοιογενές ένζυμο (ανάλυση με SDS-PAGE, HPLC, N-τελική αποικοδόμηση).

B17. N.E. Labrou (2000). Dye Affinity Labelling of yeast Alcohol Dehydrogenase. *Enzyme Inhibition*, 15, 487-496.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση με τη δραστική διχλωροτριαζινική χρωστική Vilmafix Blue A-R σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην εργασία B6. Επιπλέον, έγινε λεπτομερής περιγραφή των σταδίων καθαρισμού και ανάλυσης της χρωστικής με τη χρήση χρωματογραφίας LC και HPLC.

B18. N. E. Labrou, D. J. Rigden & Y. D. Clonis (2000). Characterization of NAD⁺ binding site of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 267, 6657-6664.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο ακριβέστερος χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ της ριβόζης του NAD⁺ και του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση από *Candida boidinii*. Πραγματοποιήθηκε σήμανση συγγένειας του ενζύμου από το δραστικό νουκλεοτιδικό παράγωγο 2',3'-dialdehyde-ADP (oADP). Η μελέτη έδειξε ότι το oADP αλληλεπιδρά εκλεκτικά και μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο με σχηματισμό βάσης Schiff. Πρωτεολυτική πέψη και κλασμάτωση με HPLC του τροποποιημένου με [¹⁴C]oADP ενζύμου, οδήγησε στην απομόνωση ενός σημασμένου πεπτιδίου. Ανάλυση της αλληλουχίας του σημασμένου πεπτιδίου έδειξε ότι το τροποποιημένο αμινοξύ είναι η Lys-360. Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της Lys-360 σε Ala έδειξε ότι το αμινοξύ συμμετέχει στον καθορισμό της εκλεκτικότητας ως προς το συνένζυμο. Κατασκευή του δομικού μοντέλου του ενζύμου και προσομοίωση των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-συνενζύμου με βιοϋπολογιστικές μεθόδους, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις Gln197 σε His και Asp195 σε Ser μπορούν να δημιουργήσουν τις απαραίτητες δομικές αλλαγές στη νουκλεοτιδική περιοχή δέσμευσης του ενζύμου, ώστε να μπορεί να λειτουργήσει καταλυτικά με το NADP⁺ σαν συνένζυμο.

B19. Y.D. Clonis, N.E. Labrou, V. Kotsira, K. Mazitsos, S. Melisis, & G. Gogolas. (2000), Biomimetic Dyes as Affinity Chromatography Tools in Enzyme Purification. *J. Chromatogr.*, 891, 33-44.

Στο άρθρο γίνεται ανασκόπηση των βιομιμητικών χρωστικών. Αναπτύσσεται ο σχεδιασμός τους και περιγράφεται η εφαρμογή τους στον καθαρισμό πρωτεϊνών και ενζύμων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

B20. N. E. Labrou & D. J. Rigden (2001). Active site characterization of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase. *Biochem. J.*, 354, 455-463.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η cDNA κλωνοποίηση (η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου του ενζύμου έχει κατατεθεί στη βάση δεδομένων του European Bioinformatics Institute, με Accession No: AJ011046), η ετερόλογος παραγωγή σε *E. coli* και η πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση από *Candida boidinii*. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκφράζεται σε ποσοστό 20% του συνόλου των διαλυτών πρωτεϊνών του *E. coli*. Ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου που αναπτύχθηκε στην εργασία B4. Κύριος στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου με σκοπό το σχεδιασμό μεταλλάξεων, στόχος των οποίων θα είναι η βελτίωση των καταλυτικών του χαρακτηριστικών (αύξηση k_3 , μείωση K_m). Με εφαρμογή κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης και μοριακής μοντελοποίησης αποδείχτηκε ότι τα υδρόφοβα αμινοξέα Phe69 και Ile175 συμμετέχουν στο μηχανισμό αποσταθεροποίησης των αντιδρώντων και σταθεροποίησης των προϊόντων της αντίδρασης. Το αμινοξύ Arg258 συμμετέχει στη σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου του H κατά τη μεταφορά του από το μυρμηκικό οξύ στο συνένζυμο NAD^+ . Τα αμινοξέα Asn119 και His311 συμμετέχουν στη δέσμευση του μυρμηκικού οξέος και στον καθορισμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς αυτό. Τέλος τα αμινοξέα Gln287 και His311 καθορίζουν την εξάρτηση των κινητικών σταθερών k_3 και K_m^{HCOOH} από το pH.

B21. N.E. Labrou (2001) Dye-ligand affinity adsorbents for enzyme purification *Mol. Biotechnology*, 20, 77-84.

Το άρθρο αυτό είναι τροποποιημένη έκδοση της εργασίας Γ2, το οποίο συμπεριλήφθηκε σε ειδική έκδοση του περιοδικού *Mol. Biotechnology*, κατόπιν προσκλήσεως από τον Εκδότη. Παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέθοδοι και τα υλικά της χρωματογραφίας συγγένειας σε ακινητοποιημένες χρωστικές και δίνονται αναλυτικά πρωτόκολλα για τη σύνθεση, καθαρισμό και ακινητοποίηση βιομιμητικών χρωστικών.

B22. N.E. Labrou, L.V. Mello & Y. D. Clonis (2001). Functional and structural roles of the glutathione binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem. J*, 358, 101-110.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η κλωνοποίηση, ετερόλογος παραγωγή σε *E. coli* και πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου από καλαμπόκι. Το ένζυμο έχει μεγάλη σημασία στη γεωπονία αφού συμμετέχει στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του φυτικού κυττάρου από τα χλωροτριαζινικά και ακετανυλιδικά φυτοφάρμακα. Το C-τελικό άκρο του ενζύμου τροποποιήθηκε γενετικά και ενσωματώθηκε σε αυτό 'ουρά' από 6-ιστιδίνες για τον εύκολο καθαρισμό του σε μεταλλοχηλική στήλη συγγένειας. Κύριος στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου με σκοπό το σχεδιασμό μεταλλάξεων, στόχος των οποίων θα είναι η βελτίωση των καταλυτικών του χαρακτηριστικών (αύξηση k_3 , μείωση K_m) έναντι των ζιζανιοκτόνων atrazine και alachlor. Κινητική ανάλυση του ενζύμου έδειξε ότι ακολουθεί τυχαίο αλληλοδιάδοχο Bi-Bi ταχείας ισορροπίας μηχανισμό δέσμευσης των δύο υποστρωμάτων. Το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας της αντίδρασης είναι η απελευθέρωση των προϊόντων. Πέντε αμινοξέα (Ser11, His40, Lys41, Gln53 και Ser69) από την περιοχή δέσμευσης του γλουταθείου

επιλέχθηκαν και εκτιμήθηκε η συνεισφορά τους στον καταλυτικό μηχανισμό εφαρμόζοντας τεχνικές κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, μοριακής μοντελοποίησης και μοριακής δυναμικής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αμινοξέα αυτά: i) ρυθμίζουν την K_m του ενζύμου για το γλουταθείο, ii) επηρεάζουν τον ιονισμό της -SH ομάδας του γλουταθείου και κατά συνέπεια τη δραστηριότητα του, iii) συμμετέχουν στη ρύθμιση της καταλυτικής σταθεράς k_{cat} επηρεάζοντας το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας της αντίδρασης, iv) συμμετέχουν στον καθορισμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου έναντι του ξενοβιοτικού υποστρώματος, και v) επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα και την κινητικότητα του 310-ελικοειδούς τμήματος της α -έλικας H2 (αμινοξέα 35 έως 46). Ειδικά η μετάλλαξη Gln53 σε Ala είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της σταθεράς K_m για το ξενοβιοτικό υπόστρωμα κατά 8-φορές. Η διαπίστωση αυτή αποτέλεσε τη βάση για τον ανασχεδιασμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου έναντι των χλωροτριαζινικών και ακετανυλιδικών φυτοφαρμάκων.

B23. N.E. Labrou, L.V. Mello & Y. D. Clonis (2001). The conserved Asn49 of maize glutathione S-transferase I modulates substrate binding, catalysis and intersubunit communication. *Eur. J. Biochem*, 268, 3950-3957.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο ρόλος του αμινοξέος Asn49 στο ένζυμο *S*-μεταφοράση του γλουταθείου από αραβόσιτο, χρησιμοποιώντας τεχνικές κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης και μοριακής μοντελοποίησης. Η Asn49Ala μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου εμφάνισε τις ακόλουθες διαφορές συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου: αλλοστερική κινητική με θετική συνεργεία ως προς τη δέσμευση του ξενοβιοτικού υποστρώματος (σταθερά Hill 1.9), μικρότερη K_m για το ξενοβιοτικό υπόστρωμα και τέσσερις φορές περίπου μικρότερη δραστηριότητα. Διαπιστώθηκε ότι κύριος ρόλος της Asn49 είναι η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και κινητικότητας της α -έλικας H2 και της α -έλικας H3. Απομάκρυνση της αμιδικής ομάδας της Asn κατά τη μετάλλαξη,

καταστρέφει σημαντικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο υπομονάδων, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης της α -έλικας H3 που έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση αλλοστερικών φαινομένων. Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται για πρώτη φορά η δημιουργία μεταλλαγμένης μορφής του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου με αλλοστερικά χαρακτηριστικά ως προς τη δέσμευση του ξενοβιοτικού υποστρώματος.

B24. N.E. Labrou, N. Bhogal., C.R. Hurrell, J.B.C. Findlay (2001). Interaction of Met297 in the seventh transmembrane segment of the tachykinin NK2 receptor with neurokinin A. *J. Biol. Chem.*, 276, 37944-37949.

Το νευροπεπτίδιο νευροκινίνη Α και ο αντίστοιχος του υποδοχέας νευροκινίνη-2 εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως η φλεγμονή, σύσπαση των μαλακών μυών, πόλωση των κεντρικών νευρώνων κ.α. Σημειακές κατευθυνόμενες μεταλλάξεις του υποδοχέα έχουν προσεγγιστικά δείξει ότι η περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές περιοχές από τις έλικες II, III, V, VI και VII και εξωκυτταρικές περιοχές προς το N-τελικό άκρο. Για τον ακριβή καθορισμό της θέσης αυτής, εφαρμόστηκε μια νέα μεθοδολογία. Αρχικά έγιναν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις σε κυστεΐνη, των αμινοξέων του υποδοχέα που υπάρχει υποψία ότι αλληλεπιδρούν με τη νευροκινίνη Α. Ακολούθως, κατά την αλληλεπίδραση των μεταλλαγμένων αυτών μορφών του υποδοχέα με τα υποκατεστημένα κυστεϊνικά ανάλογα της νευροκινίνης Α (που παρουσιάστηκαν στην εργασία Labrou, et al., 1999, *Peptides*, 20, 795-801), κατέστη δυνατός ο σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού, μεταξύ των -SH ομάδων του πεπτιδίου και υποδοχέα. Ειδικότερα, τα ανάλογα της νευροκινίνης Α με κυστεΐνη στη θέση 9 και 10 έδειξαν να σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό με την μεταλλαγμένη μορφή Met297Cys του υποδοχέα.

Η μελέτη αυτή έδωσε για πρώτη φορά σαφή εικόνα της αλληλεπίδρασης νευροκινίνης-2/νευροκινίνης Α και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το υδρόφοβο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου

αλληλεπιδρά με αμινοξέα στο εσωτερικό των διαμεμβρανικών περιοχών ενώ το υδρόφιλο N-τελικό του άκρο με τις εξωκυτταρικές περιοχές του υποδοχέα. Τα παραπάνω πειράματα μας επέτρεψαν στον επανασχεδιασμό του πρωτεϊνικού προτύπου του υποδοχέα αλλά και στην πρόβλεψη άλλων αμινοξέων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση.

B25. N.E. Labrou (2003) Design and selection of affinity ligands for affinity chromatography. *J. Chromatogr. B*, 790, 67-78.

Το άρθρο συμπεριλήφθηκε σε ειδική έκδοση του περιοδικού *J. Chromatogr. B*, κατόπιν προσκλήσεως από τον Εκδότη. Στο άρθρο γίνεται ανασκόπηση των μεθόδων σχεδιασμού και επιλογής δεσμευτών συγγένειας, με εφαρμογή στη χρωματογραφία συγγένειας. Επιπλέον, αναπτύσσονται, μέσα από παραδείγματα, εφαρμογές προσροφητών συγγένειας στον καθαρισμό θεραπευτικών και αναλυτικών ενζύμων και πρωτεϊνών.

B26. Kotzia GA, Labrou N.E. (2004). S-(2,3-dichlorotriazinyl)glutathione. A new affinity label for probing the structure and function of glutathione transferases. *Eur J Biochem.*, 271(17):3503-3511.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η σύνθεση και εφαρμογή ενός νέου αλκυλιωτικού παράγοντα συγγένειας, S-2,3-διχλωροτριαζινυλ-γλουταθείο, (SDTG), που φέρει το δραστικό ηλεκτρονιόφιλο δακτύλιο της τριχλωροτριαζίνης συνδεδεμένο με την -SH του γλουταθείου. Ο παράγοντας αυτός βρήκε εφαρμογή σαν εκλεκτικός μη-αντιστρεπτός αναστολέας του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου I (GST I). Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη της αλληλεπίδρασης GST I-SDTG εφαρμόζοντας ενζυμική κινητική και χαρακτηρίστηκε το αμινοξύ που μετέχει στη χημική αντίδραση με το SDTG. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης του

χλωρίου του τριαζινικού δακτυλίου του SDTG από την πλευρική ομάδα της Met121 του ενζυμικού μορίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αμινοξέα Met121 και Phe51 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδομοριακή επικοινωνία και σταθεροποίηση των δύο υπομονάδων στο ομοδιμερές ένζυμο. Η μεταλλαγμένη μορφή Phe51Ala εμφανίζει απώλεια ενδομοριακής επικοινωνίας και μειωμένη ικανότητα σχηματισμού ομοδιμερούς ενζύμου. Το εύρημα αυτό αποτελεί την πρώτη προσέγγιση σχεδιασμού μονομερούς μορφής του ενζύμου GST, η οποία μπορεί να βρει πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

B27. Katsos NE, Labrou NE, Clonis YD (2004). Interaction of L-glutamate oxidase with triazine dyes: selection of ligands for affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 807, 277-285.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η εφαρμογή προσροφητών με ακινητοποιημένες (κετο)καρβοξυλο-βιομιμητικές και μη-βιομιμητικές χρωστικές στον καθαρισμό του ενζύμου οξειδάση του γλουταμινικού οξέος από *Streptomyces sp.* Κινητική μελέτη έδειξε ότι η προσρόφηση του ενζύμου ακολουθεί το πρότυπο της ισοθέρμου του Freundlich με σταθερές $k = 2.7 \text{ mg}^{1/2} \text{ ml}^{1/2} / \text{g}$ και $n = 1$. Οι ελεύθερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν μη-συναγωνιστικοί αναστολείς έναντι του γλουταμινικού οξέος. Οι βιομιμητικοί προσροφητές εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συγγένεια έναντι των μη-βιομιμητικών. Συγκεκριμένα, ο προσροφητής με βιομιμητικό υποκαταστάτη το 4-αμινοφαινυλοξανυλικό εμφανίζει την υψηλότερη συγγένεια έναντι του ενζύμου και χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτόκολλου καθαρισμού του ενζύμου. Το πρωτόκολλο αποδίδει 335-φορές καθαρισμό με 95% ανάκτηση.

B28. Axarli I.A., Rigden D.J., Labrou NE (2004). Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *Biochem J.* 382, 885-893.

Σκοπός της εργασίας ήταν η εφαρμογή των χλωροτριαζινικών χρωστικών Vilmafix blue A-R (VBAR) και Cibacron Blue 3GA (CB3GA) στο δομικό χαρακτηρισμό της υδρόφοβης περιοχής δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων (ligandin site) του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου I (GST I). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και σχεδιασμός νέων μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου με υψηλότερη συγγένεια για (πολύ)αρωματικές ξενοβιοτικές ενώσεις. Για την υλοποίηση των στόχων χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μεθόδων πρωτεϊνικής χημείας, μοριακής μοντελοποίησης και κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης. Η μελέτη έδειξε ότι η VBAR αλληλεπιδρά εκλεκτικά και μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο ($K_D = 35.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$ και $k_3 = 0.47 \text{ min}^{-1}$), ενώ η CB3GA αντιστρεπτά ($K_D = 12.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$) και συμπεριφέρεται σαν συναγωνιστικός αναστολέας. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης του χλωρίου του τριαζινικού δακτυλίου της χρωστικής από κάποια δραστική ομάδα αμινοξέος του πρωτεϊνικού μορίου. Πρωτεολυτική πέψη και κλασμάτωση του τροποποιημένου με τη χρωστική ενζύμου οδήγησε στην απομόνωση ενός σημασμένου πεπτιδίου, του οποίου η αμινοξική ανάλυση έδειξε ότι το τροποποιημένο αμινοξύ είναι Lys41. Τα αποτελέσματα βρήκαν εφαρμογή στη χαρτογράφηση της υδρόφοβης περιοχής δέσμευσης ξενοβιοτικών ενώσεων στην GST I. Η μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου Ile118Phe εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια ($3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$) συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου για πολυαρωματικές ξενοβιοτικές ενώσεις. Η μορφή αυτή μπορεί να βρει εφαρμογή σαν μεταφορέας τέτοιων ενώσεων σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

B29. Labrou N.E., Rigden D.J., Clonis Y.D. (2004). Engineering the pH-dependence of kinetic parameters of maize glutathione S-transferase I by site-directed mutagenesis. *Biomol Eng.* 21(2), 61-66.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη της εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων (V_{\max} και K_m) από το pH του άγριου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου I (GST I). Τα αμινοξέα (Ser11, His40, Asn49, Lys41, Gln53 και Ser69) τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή δέσμευσης του γλουταθείου μεταλλάχθηκαν σε Ala και στις μεταλλαγμένες μορφές εκτιμήθηκε κινητικά και φασματοσκοπικά η εξάρτηση των V_{\max} και K_m από το pH. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι τα παραπάνω αμινοξέα και ιδιαίτερα η Lys41, Gln53 και Ser69 αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν την εξάρτηση της ενζυμικής ταχύτητας από το pH.

B30. Labrou N.E., Rigden D.J. (2004). The structure-function relationship in the clostripain family of peptidases. *Eur J Biochem.* 271(5), 983-992.

Στην εργασία αυτή με συνδυασμό μεθόδων πρωτεϊνικής χημείας, βιοϋπολογιστικής, ενζυμικής κινητικής και κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του ενεργού κέντρου του πρωτεολυτικού ενζύμου clostripain από *Clostridium histolyticum*. Το αμινοξύ His176 χαρακτηρίστηκε σαν τμήμα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε με ομόλογη μοντελοποίηση πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής σημαντικών περιοχών του ενζύμου. Από τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής προέκυψε ότι το αμινοξύ Asp229 καθορίζει την υψηλή εκλεκτικότητα που εκδηλώνει το ένζυμο για κατάλοιπα Arg στη P1 θέση. Το δεδομένο αυτό μπορεί να βρεί εφαρμογή στο σχεδιασμό νέων μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου διαφορετικής εκλεκτικότητας σε σχέση με τον άγριο τύπο του ενζύμου.

B31. N.E. Labrou, G. Kotzia & Y. D. Clonis (2004). Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Prot. Eng. Des. Sel.* 17(10):741-8.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός και χαρακτηρισμός νέων μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου (GST I) διαφορετικής εκλεκτικότητας ως προς τα συνθετικά υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο και αιθακρυνικό οξύ. Δημιουργήθηκαν οι μεταλλαγμένες μορφές Trp12Ile, Trp12Pro, Phe35Leu, Ile118Phe με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και μελετήθηκε η συνεισφορά κάθε μετάλλαξης στις κινητικές σταθερές (k_{cat} , K_m) και στις θερμοδυναμικές παραμέτρους (ΔH , ΔS και E_a) της καταλυτικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αμινοξέα Trp12, Phe35 και Ile118 παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη μορφή Ile118Phe εμφανίζει ~4-φορές υψηλότερη εκλεκτικότητα για τα συνθετικά ξενοβιοτικά υποστρώματα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο και αιθακρυνικό οξύ. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν τη βάση για τον ανασχεδιασμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου έναντι άλλων ξενοβιοτικών υποστρωμάτων.

B32. I. Axarli, A. Prigipaki and N.E. Labrou (2005). Engineering cytochrome P450 CYP102A2 substrate specificity by directed evolution: Production of an efficient enzyme for bioconversion of fine chemicals. *Biomol. Eng.* 22, 81-88.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο ανασχεδιασμός της εκλεκτικότητας του ενζύμου P450 CYP102A2 από *Bacillus subtilis*. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της τυχαίας μεταλλαξογένεσης με PCR. Αρχικός έλεγχος μεγάλου αριθμού μεταλλαγμένων μορφών οδήγησε στην επιλογή και ταυτοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής Pro15Ser. Η μορφή αυτή επιλέχθηκε σαν περισσότερο δραστική και μελετήθηκε κινητικά έναντι διαφόρων υποστρωμάτων όπως SDS, λαυρικό οξύ, 1,4-ναφθοκινόνη, εθακρυνικό οξύ και αμινοκαπροϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή Pro15Ser εμφανίζει ~6 με 9-φορές υψηλότερη ειδική δραστικότητα συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Η μορφή αυτή ακινητοποιήθηκε σε επόξυ-ενεργοποιημένη Sepharose (epoxy-

activated Sepharose). Η ακινητοποιημένη μορφή του ενζύμου διατηρεί το 81% της δραστηριότητας του και εμφανίζει βελτιωμένη σταθερότητα στους 37°C, συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο, με σταθερές αδρανοποίησης 12.2×10^{-3} και $2.2 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, αντίστοιχα. Η ακινητοποιημένη μορφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομετατροπές για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

B33. G.A. Kotzia, and N.E. Labrou (2005). Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J. Biotechnology*, 119(4):309-23.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* και χαρακτηρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia carotovora*. Το ένζυμο L-ασπαραγινάση καταλύει τη μετατροπή της L-ασπαραγίνης (L-Asn) σε ασπαραγινικό οξύ (L-Asp) και αμμωνία. Η ενδοφλέβια χορήγηση του ενζύμου έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική στις περισσότερες περιπτώσεις λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Η κωδική περιοχή του γονδίου του ενζύμου ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές από γενοματικό DNA από *Erwinia chrysanthemi* 3937 και το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pCR[®]T7/CT-TOPO[®]. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκφράστηκε σε κύτταρα BL21(DE3)pLysS και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή με ακινητοποιημένη L-Asn. Το καθαρό ένζυμο χαρακτηρίστηκε κινητικά και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές και η εξάρτηση αυτών από το pH, χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα (L-Asn, D-Asn, L-Gln κ.α.). Επίσης μελετήθηκαν θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά (ΔH , ΔS και E_a) της καταλυτικής αντίδρασης για διάφορα υποστρώματα. Το ένζυμο εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα έναντι της L-Asn (k_{cat} $31,4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 0,085 \text{ mM}$) και χαμηλή έναντι της L-Gln (k_{cat} $0,46 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 6,8 \text{ mM}$). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά δεδομένου ότι η εμφάνιση υψηλής δράσης L-γλουταμινάσης σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών παρενεργειών κατά την ενδοφλέβια χορήγηση του ενζύμου.

B34. N.E. Labrou (2005) Directed enzyme evolution: Bridging the gap between natural enzymes and commercial applications. *Biomol. Eng. (Editorial)*, 22, vii-ix.

Η ανασκόπηση αποτελεί εισαγωγική παρουσίαση του Ειδικού Τεύχους του περιοδικού με τίτλο 'Directed enzyme evolution'. Γίνεται συνοπτική παρουσίαση, τονίζεται η σημαντικότητα του επιστημονικού πεδίου και γίνεται σύντομη αναφορά και περιγραφή των άρθρων που περιλαμβάνονται στην ειδική έκδοση.

B35. N.E. Labrou, M. Karavangeli, A. Tsaftaris, Y. D. Clonis (2005). Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides, *Planta*, 222(1):91-7.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου S-μεταφοράση του γλουταθείου I (Trp12Ile, Phe35Leu, Ile118Phe) ως προς την αντίδραση του γλουταθείου με τα χλωροτριαζινικά και ακετανυλιδικά ζιζανιοκτόνα alachlor και atrazine. Ειδικότερα, μελετήθηκε η συνεισφορά κάθε μετάλλαξης στις κινητικές σταθερές (k_{cat} , K_m) του ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αμινοξέα Trp12, Phe35 και Ile118 παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς τα ζιζανιοκτόνα. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη μορφή Ile118Phe εμφανίζει ~4-φορές υψηλότερη εκλεκτικότητα για το ζιζανιοκτόνο alachlor αλλά όχι για το atrazine, συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου.

B36. M. Karavangeli, N.E. Labrou, Y.D. Clonis & A. Tsaftaris (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize Glutathione S-Transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol. Eng.* 22(4):121-8.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού που εκφράζουν το ένζυμο S-μεταφοράση του γλουταθείου I από καλαμπόκι (GST I). Το ένζυμο, αν και καταλύει την αντίδραση πολλών ζιζανιοκτόνων (atrazine, alachlor, chlorimuron ethyl) με το γλουταθείο, εμφανίζει υψηλότερη ειδική δραστηριότητα για το ακετανυλιδικό ζιζανιοκτόνο alachlor ($80.5 \pm 4.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Έτσι, στόχος της μελέτης αποτέλεσε η δημιουργία φυτών καπνού με υψηλότερη αντοχή στο ζιζανιοκτόνο alachlor. Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός και δημιουργία διαγονιδιακών φυτών τα οποία χαρακτηρίστηκαν με PCR και υβριδισμό κατά Western και Southern. Συγκριτικός έλεγχος του φαινότυπου των μετασχηματισμένων και μη-μετασχηματισμένων φυτών μετά από παραμονή 20 ημερών σε θρεπτικό μέσο παρουσία alachlor (0.015 g/L) έδειξε ότι τα μετασχηματισμένα φυτά εμφάνισαν σημαντικά καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερη αντοχή σε σχέση με τα μη-μετασχηματισμένα φυτά.

B37. E.V. Filippova, , Polyakov, K.M., Tikhonova, T.V., Stekhanova, T.N., Boiko, K.M., Sadihov, I.G., Tishkov, V.I., Popov, V.O., N.E. Labrou (2006) Crystal structure of the complex of NAD^+ -dependent formate dehydrogenase from metylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp.101 with formate. Crystallography Reports v51 pp.627-631.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η κρυσταλλοποίηση του ενζύμου μηρμικηκή αφυδρογονάση από *Pseudomonas* sp.101 σαν σύμπλοκο με το οργανικό υπόστρωμα του ενζύμου . Το μηρμικικό οξύ δεσμεύεται κοντά σε ένα βρόγχο που σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 123-125 και σχηματίζει υδρογονικούς δεσμούς με την Ile 122 και την Ala 120.

B38. S. Melissis, N.E. Labrou and Y.D. Clonis (2006). Nucleotide-mimetic synthetic ligands for DNA-recognizing enzymes One-step purification of Pfu DNA polymeraseJ. Chromatogr. A 1122(1-2):63-75.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία νέα βιβλιοθήκη προσροφητών με νουκλεοτιδικά ανάλογα. Η βιβλιοθήκη συντέθηκε σε στερεά φάση χρησιμοποιώντας την δομική μονάδα της 1,3,5-τριαζίνη (Trz) για τη σύνδεση και ακινητοποίηση σε Sepharose. Σαν υποκαταστάτες στην τριαζίνη χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα τόσο της αδενίνης και της γουανίνης όσο και αρωματικά και αλληφατικά σουλφονικά και φωσφονικά ανάλογα. Η βιβλιοθήκη των προσροφητών συγγένειας μελετήθηκε ως προς την ικανότητα της να δεσμεύει και να καθαρίζει την ανασυνδυασμένη *Pfu* DNA πολυμεράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές στη συγγένεια δέσμευσης των μιμητικών προσροφητών για το προς μελέτη ένζυμο ως αποτέλεσμα μικρών αλλαγών στη δομή των προσροφητών. Ο μιμητικός προσροφητής με υποκαταστάτες 9-αμινοαιθυλ-αδενίνη και σουλφανυλικό οξύ επέδειξε την υψηλότερη καθαριστική ικανότητα για το ένζυμο ενσωματώθηκε σε ένα πρωτόκολο καθαρισμού ενός χρωματογραφικού σταδίου του ενζύμου από εκχύλισμα κυττάρων *E. coli* BL21(DE3)pLysS προσφέροντας υψηλή ανάκτηση και καθαρισμό (6,2-φορές καθαρισμό με 75% ανάκτηση). Κινητική μελέτη έδειξε ότι η προσρόφηση του ενζύμου στον μιμητικό προσροφητή είναι εκλεκτική και ακολουθεί το πρότυπο της ισοθέρμου του Langmuir ($K_D = 83$ nM). Μοριακή μοντελοποίηση της δομής του ενζύμου με τη μέθοδο του συγκριτικού σχεδιασμού και μελέτη των αλληλεπιδράσεων με τον μιμητικό δεσμευτή έδειξαν ότι ο δεσμευτής πιθανότατα αλληλεπιδρά με το B-motif μια υψηλά συντηρημένη περιοχή των DNA πολυμερασών και ειδικότερα με τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys488 και Tyr495.

B39. D. Platis and N.E. Labrou (2006) Development of an Aqueous Two-Phase Partitioning System for Fractionating Therapeutic Proteins from Tobacco Extract. J. Chromatogr. A 1128(1-2):114-24.

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένα υδατικό διφασικό σύστημα κατανομής (Aqueous Two-Phase Partitioning System, ATPS) προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό στάδιο διαχωρισμού θεραπευτικών ενζύμων και αντισωμάτων από εκχύλισμα φύλλων καπνού. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερή μελέτη της επίδρασης του pH, της ιοντικής ισχύος του συστήματος, του τύπου των πολυμερών, του μοριακού τους βάρους και συγκέντρωσης, στην ικανότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών του καπνού από το ένζυμο νευραμινιδάση (NA) από τον ιο της γρίπης και το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) 2F5 και 2G12. Ένα υδατικό διφασικό σύστημα πολυεθυλενογλυκόλης/φωσφορικών (PEG/Pi) με σύσταση 12% (w/w) PEG 1500 και 13% (w/w) διάλυμα φωσφορικών, pH 5, επιλέχθηκε ως το σύστημα με την υψηλότερη εκλεκτικότητα. Στις επιλεγμένες συνθήκες, επιτεύχθηκε σημαντικός καθαρισμός (3-4-φορές) με υψηλή ανάκτηση (~ 95%) για τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Επιπρόσθετα, το σύστημα επιτρέπει την απομάκρυνση και άλλων μικρού μοριακού βάρους μεταβολιτών του φυτού, όπως πολυφαινόλες και τοξικά αλκαλοειδή. Το σύστημα μπορεί να βρει πληθώρα εφαρμογών ως μια οικονομική μέθοδος εκχύλισης για τον αρχικό διαχωρισμό ουσιών με φαρμακευτική σημασία από διαγονιδιακό καπνό.

B40. D. Platis, C.A. Sotriffer and N.E. Labrou (2006) Lock-and-key motif as a concept for designing affinity adsorbents for protein purification. J Chromatogr A. 1128(1-2):138-51.

Το μοτίβο κλειδαριάς-κλειδιού (lock-and-key, LAK) Phe-Gly-Gln, ένα κοινό δομικό μοτίβο που συναντάται στην περιοχή σύνδεσης μεταξύ των δύο υπομονάδων του ενζύμου μεταφοράση του γλουταθείου (GST), παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του ομοδιμερούς και στη βιομοριακή αναγνώριση. Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά του μοτίβου LAK χρησιμοποιήθηκαν για τον εκ νέου (*de novo*) σχεδιασμό και συνδυαστική σύνθεση μιας 13-μελούς βιβλιοθήκης ακινητοποιημένων προσροφητών, έχοντας ως βασικό προσροφητή τη δομή Phe-Trz-X, που

μιμείται το μοτίβο LAK. Η δομική μονάδα της 1,3,5-Τριαζίνης (Trz) χρησιμοποιήθηκε ως ικρίωμα για την σύνθεση, με διαφορετικά αμινοξέα ως υποκαταστάτες. Η βιβλιοθήκη των προσροφητών συγγένειας μελετήθηκε ως προς την ικανότητα της να δεσμεύει το πρωτεόμα από καλαμπόκι και ανθρώπινο ορό. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές στη συγγένεια δέσμευσης των LAK-μιμητικών προσροφητών για ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών και ενζύμων (π.χ. χυμοθρυψίνη, καταλάση, L-ασπαραγινάση, αντίσωμα 2F5) ως αποτέλεσμα μικρών αλλαγών στη δομή του προσροφητή. Ένας LAK-μιμητικός προσροφητής ενσωματώθηκε σε ένα πρωτόκολο καθαρισμού ενός βήματος του μονοκλωνικού αντισώματος κατά του ανθρώπινου ιού ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) 2F5 (mAb 2F5) από εκχύλισμα σπερμάτων καλαμποκιού στο οποίο είχε προστεθεί εξωγενώς το αντίσωμα, προσφέροντας υψηλή ανάκτηση (70-80%) και καθαρισμό (>95%). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχή της φυσικής αναγνώρισης όπως παρουσιάζεται στο μοτίβο κλειδαριάς-κλειδιού, σε συνδυασμό με εκ νέου συνδυαστικό σχεδιασμό μπορεί να οδηγήσει σε συνθετικούς προσροφητές συγγένειας, με εφαρμογές στην κατιούσα επεξεργασία ενζύμων και πρωτεϊνών.

B41. B.J. Smith, T. Huyton, R.P. Joosten, J.L. McKimm-Breschkin, J-G. Zhang, C.S. Luo, M-Z. Lou, N. E. Labrou, and T.P.J. Garrett (2006). X-ray Crystal Structure of a calcium deficient form of influenza virus neuraminidase: implications for substrate binding. Acta Crystal D: Biological Crystallography 62(Pt 9):947-52.

Στην παρούσα εργασία επιλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X μία νέα μορφή της δομής του ενζύμου νευραμινιδάση (υπότυπος N9) του ιού της γρίπης. Η δομή επιλύθηκε σε 2.2 Å. Σε προηγούμενες δομές του ενζύμου σε κάθε υπομονάδα υπήρχε ένα ιόν ασβεστίου συμπλοκοποιημένο με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ιδιαιτερότητα της παρούσας δομής έγκειται στο γεγονός ότι σε τρεις από τις τέσσερις υπομονάδες του ενζύμου το ιόν

του ασβεστίου απουσιάζει με αποτέλεσμα να εμφανίζονται δομικές αλλαγές στην τριτοταγή δομή του ενζύμου (π.χ. περιοχές 245-251, 295-298, 342-344) κοντά στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος. Οι αλλαγές αυτές επιρεάζουν την διαμόρφωση των αμινοξικών καταλοίπων (π.χ. Asp297, Asn347) που συμμετέχουν σε σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος και πιθανότατα προκαλούν αδρανοποίηση του ενζύμου απουσία ιόντων ασβεστίου. Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν θειικά ιόντα τα οποία καταλαμβάνουν καθορισμένες θέσεις τόσο στο ενεργό κέντρο και ειδικότερα την περιοχή του τοποθετείται η καρβοξυλομάδα του σιαλικού οξέος, όσο και σε γειτονικές περιοχές αυτού. Η δομή αυτή και οι θέσεις που καταλαμβάνουν τα θειικά ιόντα χησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό νέων σουλφονικών αναστολέων όπως περιγράφεται στην εργασία B37.

B42. D. Platis, B.J. Smith, T. Huyton and N.E. Labrou (2006) Structure-guided design of a novel class of benzyl-sulfonate inhibitors for influenza virus neuraminidase. *Biochem. J.* 399(2):215-23.

Το ένζυμο νευραμινιδάση (NA) του ιού της γρίπης (Influenza) είναι ένας αντι-ϊικός στόχος εξαιρετικής φαρμακευτικής σημασίας, εξαιτίας του σημαντικού της ρόλου να υδρολύει κατάλοιπα σιαλικού οξέος από γλυκοπρωτείνες της κυτταρικής επιφάνειας και να διευκολύνει την έξοδο των ιικών σωματιδίων από τα μολυσμένα κύτταρα. Η παρούσα εργασία περιγράφει το σχεδιασμό συνθετικών αναστολέων του ενζύμου. Ο σχεδιασμός των αναστολέων βασίστηκε σε δομικές πληροφορίες που ελήφθησαν από την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου σαν σύμπλοκο με θειικά ανιόντα (εργασία B36) σε συνδυασμό με αποτελέσματα μελετών με την τεχνική σύμπτωσης συγγένειας και μοριακής μοντελοποίησης. Οι αναστολείς που σχεδιάστηκαν αποτελούν δομικά τμήματα της πολυσουλφονο-τριαζινο-χρωστικής Cibacron Blue 3GA. Ο αναστολέας 3-(4-χλωρο-6-[(3-σουλφινοφενυλ)αμινο]-1,3,5-τριαζινυλ-2-}αμινο)βενζοσουλφονικό οξύ εμφάνισε την

υψηλότερη συγγένεια για το ένζυμο ($K_D = 0.13 \pm 0.05 \mu\text{M}$). Ο αναστολέας αυτός αποτελεί νέο δομικό ικρίωμα για τον περετέρω σχεδιασμό νέων συνθετικών αναστολέων για τη ΝΑ.

B43. T. Dalakouras, B. J. Smith, D. Platis M. M.J. Cox and N. E. Labrou (2006) Development of recombinant protein-based influenza vaccine: expression and purification of H1N1 influenza virus neuraminidase J. Chromatogr. A, 1136(1):48-56.

Η επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη νευραμινιδάση (ΝΑ) του ιού της γρίπης H1N1 (influenza) είναι ένα ἴκό ένζυμο υψηλής σημασίας με πολλές βιοιατρικές εφαρμογές. Έτσι, η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής ανιούσας και κατιούσας στρατηγικής για την έκφραση και καθαρισμό του ενζύμου αυτού είναι υψηλής τεχνολογική σημασίας. Στην παρούσα μελέτη το γονίδιο ΝΑ από το στέλεχος του ιού influenza H1N1 (A/Beijing/262/95) κλωνοποιήθηκε από ἴκό RNA και εκφράστηκε σε κύτταρα εντόμων expresSF+ χρησιμοποιώντας το σύστημα έκφρασης του ιού των εντόμων baculovirus (BVES). Η περιορισμένη βιβλιοθήκη προσροφητών συγγενείας, που ο σχεδιασμός και η σύνθεση της περιγράφηκε στην εργασία Νο 35, εκτιμήθηκε ως προς την ικανότητά της να δεσμεύει και να καθαρίζει την νευραμινιδάση. Ένας ακινητοποιημένος προσροφητής που έφερε την φαινυλαλανίνη και την ισολευκίνη δεσμευμένες με το δακτύλιο της 1,3,5-χλωροτριάζινης (Phe-Trz-Ile) επέδειξε υψηλή συγγένεια για τη νευραμινιδάση. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ισορροπίας προσρόφησης (K_D 0,13 μM) και μοριακής μοντελοποίησης προκειμένου να δώσουν μια λεπτομερή εικόνα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσροφητή Phe-Trz-Ile και της νευραμινιδάσης. Αυτός ο προσροφητής συγγενείας χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη ενός σύντομου πρωτοκόλου καθαρισμού για τη νευραμινιδάση, που επέδειξε 335-φορές καθαρισμό σε ένα χρωματογραφικό στάδιο.

B44. G. A. Kotzia, and N.E. Labrou (2007). L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, Expression and Characterization. J. Biotechnol. 127(4):657-69.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] και χαρακτηρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* 3937. Η κωδική περιοχή του γονδίου του ενζύμου ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές από γενοματικό DNA από *Erwinia chrysanthemi* 3937 και το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pCR[®]T7/CT-TOPO[®]. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)pLysS και καθαρίστηκε σε ένα χρωματογραφικό στάδιο εφαρμόζοντας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλη S-Sepharose FF με ανάκτηση 69,8% και 15,4-φορές καθαρισμό. Το καθαρό ένζυμο χαρακτηρίστηκε κινητικά και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές, χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα (π.χ. L-Asn, D-Asn, L-Gln κ.α.). Το ένζυμο εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα έναντι της L-Asn (k_{cat} $23,8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 0,058 \text{ mM}$) και χαμηλή έναντι της L-Gln (k_{cat} $4,3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 6,7 \text{ mM}$). Επίσης μελετήθηκαν τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά (ΔH , ΔS και E_a) της καταλυτικής αντίδρασης και εκτιμήθηκε η θερμοσταθερότητα τόσο του ελεύθερου όσο και του ακινητοποιημένου ενζύμου. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε σε Sepharose CL-6B χρησιμοποιώντας δις-οξειράναιο σαν αντιδραστήριο ενεργοποίησης. Κατά την ακινητοποίηση το ένζυμο διατήρησε υψηλή δραστηριότητα (60%) συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο. Μελέτη της θερμοσταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου έδειξε ότι το ένζυμο εμφανίζει διφασική κινητική αδρανοποίησης με σταθερές αδρανοποίησης $0.702 \pm 0.16 \text{ d}^{-1}$ και $3.3 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4} \text{ d}^{-1}$ για τις δύο φάσεις της αδρανοποίησης, αντίστοιχα.

B45. S. Melissis, N.E. Labrou, Y.D. Clonis (2007). One-step purification of *Taq* DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. Biotechnol J. 2(1):121-32.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της βιβλιοθήκη προσροφητών με νουκλεοτιδικά ανάλογα που περιγράφηκε στην εργασία B33 στον καθαρισμό του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση. Το cDNA που κωδικοποιεί για το ένζυμο υποκλωνοποιήθηκε με PCR στον φορέα έκφρασης pQE-70 και δραστικό ένζυμο εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα σε κύτταρα *E. coli* M15 (pREP4). Ο μμητικός προσροφητής με υποκαταστάτες 9-αμινοαιθυλγουανίνη και ανιλίνη-2-σουλφονικό οξύ επέδειξε την υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού για το ένζυμο. Ο προσροφητής αυτός ενσωματώθηκε σε πρωτόκολο καθαρισμού ενός χρωματογραφικού σταδίου του ενζύμου από εκχύλισμα *E. coli* M15 (pREP4) προσφέροντας υψηλή ανάκτηση και καθαρισμό (ειδική δραστηριότητα 61,500 units/mg). Μελέτη των αλληλεπιδράσεων του μμητικού δεσμευτή έδειξε ότι ο δεσμευτής, όπως και στην περίπτωση της *Pfu* DNA πολυμεράσης, μπορεί να αλληλεπιδρά με το B-motif και ειδικότερα με τα αμινοξικά κατάλοιπα Tyr671 και Lys663. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχή της βιολογικής αναγνώρισης σε συνδυασμό με εκ νέου συνδυαστικό σχεδιασμό μπορεί να οδηγήσει σε συνθετικούς προσροφητές συγγενείας, με εφαρμογές στην κατιούσα επεξεργασία ενζύμων.

B46. G.A. Kotzia, K. Lappa, and N.E. Labrou (2007). Tailoring structure-function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochem J.* 404(2):337-343.

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται μία προσέγγιση η οποία βασίζεται σε πειράματα πρωτεϊνικής χημείας και πρωτεϊνικής μηχανικής με στόχο τον σχεδιασμό και την παραγωγή μία τροποποιημένης μορφής του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia carotovora* (*EcaL*-ASNase) που να εμφανίζει υψηλή σταθερότητα έναντι του πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνη. Πειράματα περιορισμένης πρωτεόλυσης με θρυψίνη έδειξαν ότι η θρυψινόλυση του ενζύμου πραγματοποιείται αρχικά με πέψη του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Lys53 και Gly54, και ακολούθως με πέψη του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Arg206-Ser207 δείχνοντας ότι

οι αρχικές θέσεις αναγνώρισης είναι τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys53 και Arg206. Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της Arg206 σε His συνοδευόμενη με χημική τροποποίηση της μεταλλαγμένης μορφής Arg206His του ενζύμου με το παράγωγο του N-υδροξυηλεκτρικού εστέρα της μεθοξυπολυαιθυλενο γλυκόλης (mPEG-SNHS) έδωσε μία νέα μορφή του ενζύμου η οποία διατηρεί το 82% της αρχικής δραστηριότητας και παράλληλα εμφανίζει σημαντικά ενισχυμένη θερμοσταθερότητα (55.6-φορές) και σταθερότητα έναντι θρυψινόλυσης (k_{obs} 0.1 min^{-1}) συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου.

B47 G. Moschopoulou, I. Papanastasiou, O. Makri, N. Lambrou, G. Economou, K. Soukouli, S.E. Kintzios (2007) Cellular redox-status is associated with regulation of frond division in *Spirodela polyrrhiza*. Plant Cell Rep. 26(12):2063-9.

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της πιθανής σχέσης μεταξύ των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και της διέγερσης διαίρεσης του υδρόβιου φυτού *Spirodela polyrrhiza*. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βιοαισθητήρα εκλεκτικού για τον προσδιορισμό ενεργών μορφών οξυγόνου και άλλων αποπτωτικών παραμέτρων όπως η κυτταροπλασματική συγκέντρωση του κυτοχρώματος c, την πόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και τη δράση του ενζύμου κασπάση-3. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η διαίρεση μπορεί να διεγερθεί με την παρατηρούμενη μείωση των ελεύθερων ριζών και τη σχετική αποφυγή αποπτωτικών οδών στα φυτά.

B48. K. Ramessar, T. Rademacher, M. Sack M, Stadlmann J, Platis D, Stiegler G, Labrou N, Altmann F, Ma J, Stöger E, Capell T, Christou P. (2008) Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. Proc Natl Acad Sci USA. 105(10):3727-32.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε γενετική τροποποίηση φυτών καλαμποκιού ώστε να εκφράζετε το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIV 2G12. Η μελέτη παρουσιάζει τη διαδικασία γενετικής τροποποίησης που είχε σαν αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλών επιπέδων έκφρασης σε σπόρους καλαμποκιού (~100 µg/g ξηρού σπόρου). Το ετερόλογα παραγόμενο αντίσωμα εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτό που παράγεται σε κυτταρικές σειρές CHO αναφορικά με την αναγνώριση του αντίστοιχου του αντιγόνου. Επίσης στην εργασία παρουσιάζετε για πρώτη φορά μια νέα αποτελεσματική διαδικασία καθαρισμού του αντισώματος 2G12 προσφέροντας υψηλή ανάκτηση και καθαρισμό (καθαρότητα ~90%). Η διαδικασία καθαρισμού βασίζεται σε δύο χρωματογραφικά στάδια και ειδικότερα χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (S-Sepharose FF) και μεταλλοχηλικής συγγένειας (Zn²⁺-iminodiacetic acid-Agarose). Τέλος στην εργασία γίνεται μελέτη των μεταγραφικών τροποποιήσεων της ετερόλογης πρωτεΐνης και ειδικότερα των μορφών γλυκοσυλίωσης που έχει υποστεί το αντίσωμα 2G12.

B49. Platis D, Labrou NE.(2008) Affinity chromatography for the purification of therapeutic proteins from transgenic maize using immobilized histamine. J. Sep. Sci. 31(4):636-45.

Στην εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση προσροφητών συγγένειας με δεσμευτές συγγένειας όπως: ισταμίνη, τρυπταμίνη, φαινυλαμίνη και τυραμίνη. Οι προσροφητές συντέθηκαν χρησιμοποιώντας χημεία στερεάς φάσης και ακινητοποιήθηκαν σε Sepharose CL-4B μέσω χημείας δις-οξιρανίου (1,4-butanediol diglycidyl ether). Οι προσροφητές που προέκυψαν αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καθαρίζουν το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIV 2F5 από εκχύλισμα σπερμάτων καλαμποκιού και φύλων καπνού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι προτεινόμενοι προσροφητές εμφάνισαν αξιοσημείωτη ικανότητα καθαρισμού για το αντίσωμα. Ειδικότερα ο προσροφητής με ακινητοποιημένη ισταμίνη απέδωσε >95% καθαρότητα και >90% ανάκτηση σε ένα χρωματογραφικό στάδιο (έκλυση με 0.4 M KCl). Ο προσροφητής επιπλέον αξιολογήθηκε ως

προς την ικανότητα του να καθαρίζει το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIV 2G12 και το ένζυμο α-χυμοθρυψίνη. Λαμβάνοντας υπόψη το χαμηλό κόστος σύνθεσης των προσροφητών και την ευκολία προσαρμογής της διαδικασίας σε μεγάλη κλίμακα προτείνεται η εφαρμογή των προσροφητών σαν εναλλακτικό στάδιο κατά τη διαδικασία κατιούσας επεξεργασίας ανασυνδυασμένων θεραπευτικών ενζύμων και πρωτεϊνών από διαγονιδιακά φυτά.

B50. E. Morou, H.M. Ismail, A.J. Dowd, J. Hemingway, N.E. Labrou, M. Paine, J. Vontas (2008) A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. Analytical Biochemistry, 378(1):60-4.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η ανάπτυξη μίας μεθόδου προσδιορισμού του εντομοκτόνου DDT [1,1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene] με την εφαρμογή του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης από *Aedes aegypti*. Το ένζυμο αυτό ανήκει στην κλάση ε και εμφανίζει υψηλή καταλυτική δράση έναντι του DDT. Η μέθοδος βασίζεται στην αλλαγή του pH του διαλύματος κατά την υδρόλυση του DDT από το ένζυμο και συνοδεύεται από απελευθέρωση HCl. Η αλλαγή του pH προσδιορίστηκε με κατάλληλο δείκτη. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε σε 3.8 μg/ml, και εμφάνισε γραμμική απόκριση στην περιοχή 12-250 μg/ml. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα και έδειξε ικανοποιητική συμφωνία (συντελεστής προσαρμογής $R^2=0.98$) με την καθιερωμένη μέθοδο που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης HPLC.

B51. D. Platis and N.E. Labrou (2008) Chemical and Genetic Engineering Strategies to Improve the Potency of Pharmaceutical Proteins and Enzymes. Current Medicinal Chemistry, 19, 1940-1955.

Στο άρθρο αυτό γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των χημικών μεθόδων και μεθόδων γενετικής μηχανικής που χρησιμοποιούνται με επιτυχία για την τροποποίηση φαρμακευτικών πρωτεϊνών και ενζύμων. Στην ανασκόπηση συμπεριλαμβάνονται τόσο χημικές προσεγγίσεις (π.χ. PEGylation) όσο και γενετικές (π.χ. μεταλλαξογένεση, κατευθυνόμενη εξέλιξη). Παρουσιάζεται συγκριτική αξιολόγηση των δύο προσεγγίσεων καθώς και επιτυχημένα παραδείγματα πολλά από τα οποία είδη βρίσκονται στη διαδικασία έγκρισης ως νέα φάρμακα.

B52. Kapoli P, Axarli IA, Platis D, Fragoulaki M, Paine M, Hemingway J, Vontas J, Labrou NE (2008) Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics, Biosensors Bioelectronics, 24(3):498-503.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός νέου βιοαισθητήρα που βασίζεται στο ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης GST I από καλαμπόκι. Στόχος της εργασίας αποτέλεσε η τροποποίηση του ενζύμου με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και η δημιουργία μίας νέας μορφής του ενζύμου (Gln53Ala) με υψηλότερη συγγένεια (9,2-φορές) ως προς το εντομοκτόνο malathion. Η αναστολή της δράσης της μεταλλαγμένης μορφής του ενζύμου (υποστρώματα GSH/CDNB) από το malathion είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή των οξεοβασικών ιδιοτήτων του διαλύματος με τρόπο ώστε να επιτρέπεται η ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης του malathion. Η μέθοδος εμφάνισε γραμμικότητα στην περιοχή 0-20 μM , επαναληψιμότητα $\pm 3-5\%$ και ανάκτηση $96.7 \pm 2.8\%$. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε υπό τη δράση γλουταραλδεϋδης και χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα προσδιορισμού malathion.

B53. Andreadeli, A. Platis, D. Tishkov, V. Popov, V., Labrou, N.E. (2008) Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP^+ . FEBS J, 275(15):3859-69.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μεταλλαξογένεση κορεσμού στο ένζυμο μυρμηκική αφυδρογονάση με στόχο την τροποποίηση της εκλεκτικότητάς του ως προς το συνένζυμο. Ο άγριος τύπος του ενζύμου αναγνωρίζει σαν συνένζυμο αποκλειστικά το NAD^+ όχι όμως το NADP^+ . Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου με ομόλογη μοντελοποίηση. Επιλέχθηκαν δύο θέσεις μεταλλαξογένεσης: Asp195 και Tyr196 οι οποίες έδειξαν *in silico* ότι καθορίζουν την εκλεκτικότητα ως προς το συνένζυμο. Εφαρμόστηκε μεταλλαξογένεση κορεσμού στις θέσεις αυτές σε δύο στάδια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βέλτιστη μορφή του ενζύμου περιέχει τις παρακάτω μεταλλάξεις: Asp195Gln/Tyr196His. Η μορφή αυτή εμφάνισε δραματική αλλαγή στην εκλεκτικότητα ως προς το συνένζυμο. Ειδικότερα, επέδειξε βελτίωση της καταλυτικής αποτελεσματικότητας έναντι του NADP^+ κατά 2×10^7 -φορές και μείωση της καταλυτικής αποτελεσματικότητας έναντι του NAD^+ κατά 900-φορές. Η μορφή Asp195Gln/Tyr196His μελετήθηκε και ως προς την πρακτική της εφαρμογή για την ανάπτυξη ενός συστήματος βιοκατάλυσης με ανακύκλωση του συνενζύμου σε σύζευξη με το ένζυμο P450 μονοξυγονάση από *Bacillus subtilis*. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε 1250-φορές περίσσεια ω-(p-nitrophenyl)dodecanoic acid (12-pNCA) έναντι του NADP^+ . Η πρώτη τάξεως ταχύτητα αντίδρασης βιομετατροπής προσδιορίστηκε ίση με $k_{\text{obs}} = 0.059 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$.

B54. D. Platis, J. Drossard, R. Fischer, J.K-C. Ma and N.E. Labrou (2008) New Downstream Processing Strategy for the Purification of Monoclonal Antibodies from Transgenic Tobacco Plants, J. Chromatogr. A. 1211(1-2):80-9.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη μιας πρωτότυπης διαδικασίας κατιούσας επεξεργασίας για τον καθαρισμό μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs 2G12 και 4E10) εκφρασμένα

σε διαγονιδιακών καπνό. Η στρατηγική βασίζεται σε πρώτο στάδιο στην εφαρμογή υδάτινων διφασικών συστημάτων (ATPS) και σε δεύτερο στάδιο σε χρωματογραφικές τεχνικές. Αρχικός στόχος της μελέτης αποτέλεσε το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIV 2G12. Αναπτύχθηκαν υδάτινα διφασικά συστήματα (PEG/φωσφορικών, 2.01-φορές αρχικός καθαρισμός) και συνδυάστηκαν με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (S-Sepharose FF, έκλουση με 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου pH 7.5 που περιείχε 0.1M NaCl) και μεταλλοχηλικής συγγένειας (Zn^{2+} -iminodiacetic acid-Sepharose 6B, έκλουση με μεταβολή pH). Η διαδικασία καθαρισμού για το mAb 2G12 απέδωσε 162-φορές καθαρισμό με 97.2% καθαρότητα και 63% απόδοση. Η διαδικασία εφαρμόστηκε και στο mAb 4E10 η οποία απέδωσε 148-φορές καθαρισμό με 96.2% καθαρότητα and 36% απόδοση.

B55. I. Axarli, P. Dhavala, A.C. Papageorgiou, N.E. Labrou. (2009) Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. J. Mol. Biol. 385(3):984-1002.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης *GmGSTU4-4* από *Glycine max*. Πραγματοποιήθηκε κινητικός χαρακτηρισμός του ενζύμου και δομικός χαρακτηρισμός με εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X. Ειδικότερα, προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου (1.75 Å) σαν σύμπλοκο με τον αναστολέα S-νιτροβενζυλ-GSH και μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του υποστρώματος και την υψηλή καταλυτική δράση που εκδηλώνει ως προς το ζιζανιοκτόνο fluorodifen. Στην εργασία προτείνεται ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης ενζύμου και εντοπίστηκε για πρώτη φορά μία θέση στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου κατάλληλη να προσδέονται μικρού μοριακού βάρους ενώσεις.

B56. I. Axarli, N.E. Labrou, C. Petrou, P. Kordopatis, N. Rassias and Y.D. Clonis (2009) Sulphonamide-Based Bombesin Prodrug Analogues For Glutathione Transferase, Useful In Targeted Cancer Chemotherapy. Eur. J. Med. Chem. 44(5):2009-16.

Στην εργασία αυτή σχεδιάστηκε ένα νέο προφάρμακο που συνδύαζε δύο δομικά τμήματα αναγνώρισης με ικανότητα ενεργοποίησης από το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης GSTA1-1 (hGSTA1-1). Το ένα τμήμα ήταν πεπτιδικό ανάλογο της βομβεσίνης (R-[Lue(13)]-bombesin, R-[Phe(13)]-bombesin και R-[Ser(3),Arg(10),Phe(13)]-bombesin, όπου $R=C_6H_5SO_2NH$) σαν στοιχείο μοριακής αναγνώρισης από τα καρκινικά κύτταρα, συνδεδεμένο με δεσμό σουλφοναμιδίου με αρωματικό ανάλογο. Το ένζυμο GSTA1-1 παρουσία γλουταθειόνης ήταν ικανό σε συνθήκες *in vitro* να διασπά το δεσμό βομβεσίνης-σουλφοναμιδίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πεπτιδίου και ενός S-αναλόγου της γλουταθειόνης με ικανότητα αναστολής του ενζύμου. Η εργασία αυτή εισάγει για πρώτη φορά την επιτυχημένη χρήση του ενζύμου GSTA1-1 στο σχεδιασμό εκλεκτικών προφαρμάκων με πιθανή εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου.

B57. G.A. Kotzia, N.E. Labrou (2009) Engineering thermal stability of L-asparaginase by *in vitro* directed evolution. FEBS J, 276(6):1750-61.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* 3937 με εφαρμογή κατευθυνόμενης εξέλιξης και στόχο τη δημιουργία νέων μορφών του ενζύμου με βελτιωμένη σταθερότητα. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της περιορισμένης επιμήκυνσης χρησιμοποιώντας σαν αρχικές μήτρες τα γονίδια του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* 3937 και *Erwinia carotovora*. Μετά την επιλογή των μεταλλαγμένων μορφών απομονώθηκε μια νέα μορφή του ενζύμου που έφερε σημειακή μετάλλαξη (Asp133Val). Η μορφή

αυτή εμφάνισε υψηλότερη θερμοσταθερότητα. Ειδικότερα, η μεταλλαγμένη μορφή εμφάνισε T_m 55.8°C ενώ ο άγριος τύπος εμφάνισε T_m 46.4°C. Στους 50 °C ο χρόνος ημιζωής του άγριου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής ήταν 2.7 και 159.7 h, αντίστοιχα. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση αυτή και επιλέχθηκαν μεταλλαγμένες μορφές οι οποίες αξιολογήθηκαν κινητικά και δομικά αναφορικά με τη θερμοσταθερότητα τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μορφή Asp133Leu εμφάνισε τη βέλτιστη θερμοσταθερότητα.

B58. Andreadeli A, Flemetakis E, Axarli I, Dimou M, Udvardi MK, Katinakis P, Labrou NE (2009) Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: A possible correlation with hypoxia. *Biochim Biophys Acta (Proteins and Proteomics)*, 1794(6):976-84.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* και ο καθαρισμός του ενζύμου μυρμηκική αφυδρογονάση από το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και χαρακτηρίστηκε κινητικά η εκλεκτικότητά του ως προς τα υποστρώματα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου με ομόλογη μοντελοποίηση και έγινε πρόβλεψη των αμινοξικών καταλοίπων τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση. Επιπλέον, μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του ενζύμου στο *Lotus japonicus* με RT-PCR και διαπιστώθηκε η πιθανή συμμετοχή του ενζύμου στο μηχανισμό υποξίας.

B59. D. Platis, A. Maltezos, J.K-C. Ma and N. E. Labrou (2009) Combinatorial de novo design and application of a biomimetic affinity ligand for the purification of human anti-HIV mAb 4E10 from transgenic tobacco. *J. Mol. Recognition*, 22(6):415-24.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται ο *de novo* σχεδιασμός ενός νέου βιομιμητικού δεσμευτή με στόχο την εφαρμογή του στον καθαρισμό του anti-HIV mAb 4E10 εκφρασμένο σε διαγονιδιακό καπνό. Ο σχεδιασμός βασίστηκε σε σύστημα έκφρασης πεπτιδίων (pFlitrx) στην επιφάνεια της *E. coli*. Μετά την διαδικασία σύρωσης και επιλογής εντοπίστηκε μία συντηρημένη δομή τριπεπτιδίου η οποία και αποτέλεσε οδηγό για το σχεδιασμό του δεσμευτή. Η δομική μονάδα της 1,3,5-τριαζίνης (Trz) χρησιμοποιήθηκε ως ικρίωμα για την σύνθεση του βιομιμητικού δεσμευτή, με δύο διαφορετικά αμινοξέα ως υποκαταστάτες (β -Ala-Trz-L-Phe). Ο δεσμευτής ακινητοποιήθηκε σε αгарόζη με εφαρμογή χημείας στερεάς φάσης και χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του mAb 4E10 από εκχύλισμα διαγονιδιακού καπνού. Ο προσροφητής εμφάνισε K_D 0.41 ± 0.05 μ M κατά την αλληλεπίδραση του με το mAb 4E10. Το mAb 4E10 καθαρίστηκε σε υψηλά επίπεδα (~95%) με ανάκτηση 60-80%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχή της βιολογικής αναγνώρισης με εφαρμογή συνδυαστικού σχεδιασμού μπορεί να οδηγήσει σε συνθετικούς προσροφητές συγγενείας, με εφαρμογές στην κατιούσα επεξεργασία πρωτεϊνών.

B60. D. Platis and N.E. Labrou (2009). Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. Biotechnol. J. 4(9):1320-7.

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένα υδατικό διαφασικό σύστημα κατανομής (ATPS) προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό στάδιο διαχωρισμού θεραπευτικών αντισωμάτων (mAb 2G12 και mAb 4E10) από εκχύλισμα μη φυγοκεντρημένων φύλλων διαγονιδιακού καπνού. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερή μελέτη των συνθηκών κατανομής. Βέλτιστες συνθήκες βρέθηκαν 13.1% w/w (PEG 1500), 12.5% w/w (φωσφορικά) σε pH 5 και 8.25% w/w εκχύλισμα μη φυγοκεντρημένων φύλλων καπνού. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το mAb 2G12 και mAb 4E10 κατανέμονται στη φάση των φωσφορικών με 85 and 84% απόδοση και 2.4- / 2.1-φορές

καθαρισμό, αντίστοιχα. Το σύστημα επιτρέπει την απομάκρυνση μικρού μοριακού βάρους μεταβολιτών του φυτού, όπως πολυφαινόλες και αλκαλοειδή. Το σύστημα συνδυάστηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε Protein A. Το σύστημα μπορεί να βρει πληθώρα εφαρμογών ως μια οικονομική μέθοδος εκχύλισης για τον αρχικό διαχωρισμό ουσιών με φαρμακευτική σημασία από διαγονιδιακό καπνό.

B61. Kouri ED, Labrou NE, Garbis SD, Kalliampakou KI, Stedel C, Dimou M, Udvardi MK, Katinakis P, Flemetakis E. (2009) Molecular and Biochemical characterization of the Parvulin-type PPIases in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 150(3):1160-73.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση έκφραση και χαρακτηρισμός των parvulin-type PPIases (LjPar1, LjPar2, and LjPar3) από το φυτό *Lotus japonicus*. Πραγματοποιήθηκε εκτενής κινητικός, μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός των ενζύμων και σχεδιασμός της τρισδιάστατης δομής των ενζύμων με ομόλογη μοντελοποίηση. Προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση έναντι συνθετικών πεπτιδικών υποστρωμάτων.

B62. C.C. Sfetsas, K. Skopelitou, L. Milios, A. Venieraki, R. Todou, E. Flemetakis, P. Katinakis, N. E. Labrou. (2009) Characterization of 1,2-dibromoethane-degrading haloalkane dehalogenase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 397–404.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* και καθαρισμός του ενζύμου απαλογονάση των αλκυλαλογονιδίων από το βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Οι απαλογονάσες των αλκυλαλογονιδίων ανήκουν στην ομάδα των α/β-υδρολασών

βακτηριακής προέλευσης, που καταλύουν τη μετατροπή αλογονωμένων ενώσεων στις αντίστοιχες αλκοόλες και υδραλογόνα. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκφράστηκε σε *Escherichia coli* BL21 (DE3) και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας. Χαρακτηρίστηκε κινητικά αναφορικά με την εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου με ομόλογη μοντελοποίηση και προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση. Επιπλέον, μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του ενζύμου στο βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 με RT-PCR και προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν το ένζυμο εκφράζεται στην αρχική εκθετική φάση και επάγεται από 1,2-διβρωμοαιθάνιο.

B63. Axarli, I. Dhavala, P., Papageorgiou, A.C., & Labrou, N. (2009). Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operated by the tau class glutathione transferases. *Biochem. J.* 422(2):247-56.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε δομικός χαρακτηρισμός του ενζύμου *GmGST4-4* από *Glycine max* με εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X. Ειδικότερα, προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή σαν σύμπλοκο με το υπόστρωμα GSH (2,7 Å) και μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του υποστρώματος. Στην εργασία προτείνεται ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης του ενζύμου. Αποδείχτηκε ο μηχανισμός επαγόμενης προσαρμογής που πιθανότατα να ακολουθείται από το ένζυμο κατά τη διαδικασία της καταλυτικής αντίδρασης. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η αναδιοργάνωση των αμινοξικών καταλοίπων Arg111 και Tyr107 κατά τη δέσμευση του ξενοβιοτικού υποστρώματος φαίνεται να καθορίζει την ενδομοριακή επικοινωνία μεταξύ των G- και H-θέσεων και τη δέσμευση της GSH. Η παραπάνω μελέτη επιβεβαιώθηκε με επιράματα κινητικής ανάλυσης και κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση.

B64. Axarli, I., Georgiadou, C., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C. & Labrou, N. (2010). Investigation of the role of conserved residues Ser13, Asn48 and Pro49 in the catalytic mechanism of the tau class glutathione transferase from *Glycine max*. *Biochim Biophys Acta (Proteins and Proteomics)*. 1804, 662-667.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη του ρόλου τριών συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων: Ser13, Asn48 και Pro49 του ενζύμου *GmGST4-4* από *Glycine max*. Χρησιμοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση, κινητική ανάλυση και βιοϋπολογιστική. Ειδικότερα, τρεις μεταλλαγμένες μορφές Ser13Ala, Asn48Ala και Pro49Ala δημιουργήθηκαν και εκφράστηκαν σε *E. coli*. Οι μορφές καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν κινητικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κατάλοιπο Ser13 αποτελεί το καταλυτικό αμινοξύ που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της GSH για την επίτευξη της νουκλεόφιλης προσβολής. Τα κατάλοιπα Asn48 και Pro49 παίζουν κυρίως δομικό ρόλο και μετέχουν στην διατήρηση της τρισδιάστατης δομής της G-θέσης. Επίσης, επηρεάζουν τη θερμοσταθερότητα και την σταθερά k_{cat} χωρίς να επηρεάζουν τη φύση και το καθοριστικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης.

B65. Dowd A.J., Morou E., Steven A., Ismael H., Labrou, N.E, Paine M. Vontas J. (2010) Development of a colorimetric pH assay for the quantification of pyrethroids based on glutathione transferase. *Int. J. Environm. Anal. Chem.* 90 (12), 1-10.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός νέας χρωματομετρικής δοκιμής προσδιορισμού πυρεθροειδών που βασίζεται στο ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στην αναστολή της δράσης του ενζύμου από πυρεθροειδή που είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή των οξεοβασικών ιδιοτήτων του διαλύματος με τρόπο ώστε να επιτρέπεται η ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης τους.

B66. S.C. Melissis, A.C. Papageorgiou, N.E. Labrou, Y.D. Clonis. (2010) Purification of Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase lacking RNase activity (M-MLVH-RT) on a 9-aminoethyladenine-[1,6-diamine-hexane]-triazine, selected from a combinatorial library of dNTP-mimetic ligands. J. Chromatogr. Sci., 48, 6, 496-502.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της βιβλιοθήκη προσροφητών με νουκλεοτιδικά ανάλογα στον καθαρισμό του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLVH-RT). Ο βιομιμητικός προσροφητής με υποκαταστάτη 9-αμινοαιθυλαδενίνη-(1,6-διάμινο-εξάνιο)-τριαζίνη επέδειξε την υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού του ενζύμου με υψηλή και χωρητικότητα (1 mg ενζύμου/g υγρού προσροφητή) κάτω από βέλτιστες συνθήκες προσρόφησης (6 mM MnCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Ο προσροφητής αυτός ενσωματώθηκε σε πρωτόκολλο καθαρισμού ενός χρωματογραφικού σταδίου του ενζύμου από εκχύλισμα *E. coli* προσφέροντας υψηλή ανάκτηση και καθαρισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχή της βιολογικής αναγνώρισης σε συνδυασμό με συνδυαστικό σχεδιασμό μπορεί να οδηγήσει σε συνθετικούς προσροφητές συγγενείας, με εφαρμογές στην κατιούσα επεξεργασία ενζύμων.

B67. N.E. Labrou (2010). Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. Current Protein Peptide Science, 11, 91-100.

Στο άρθρο αυτό γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των χημικών μεθόδων και μεθόδων γενετικής μηχανικής που χρησιμοποιούνται με επιτυχία για την τροποποίηση δομής ενζύμων με τυχαία μεταλλαξογένεση. Στην ανασκόπηση συμπεριλαμβάνονται και περιγράφονται τόσο χημικές προσεγγίσεις όσο και γενετικές. Παρουσιάζεται επιτυχημένα παραδείγματα εφαρμογών στο σχεδιασμό νέων τροποποιημένων ενζύμων με βελτιωμένα δομικά ή/και κινητικά χαρακτηριστικά.

B68. N.E. Labrou, A.C. Papageorgiou, V.I. Avramis (2010). Structure-function and clinical applications of L-asparaginases. Current Medicinal Chemistry, 17(20):2183-95.

Στο άρθρο αυτό γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των δομικών και καταλυτικών ιδιοτήτων του ενζύμου L-ασπαραγινάση. Το ένζυμο L-ασπαραγινάση χρησιμοποιείται στη θεραπεία της λευχαιμίας και παρουσιάζει σημαντικό επιστημονικό αλλά και πρακτικό ενδιαφέρον. Στο άρθρο περιγράφονται με λεπτομέρεια τα φυσικοχημικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά του ενζύμου από διάφορες πηγές, ενώ σημαντική προσπάθεια γίνεται στη σύνδεση της σχέσης δομής-καταλυτικής δράσης και θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Επίσης περιγράφεται η εφαρμογή χημικών μεθόδων και μεθόδων γενετικής μηχανικής που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για την τροποποίηση της δομής του ενζύμου και το σχεδιασμό νέων τροποποιημένων μορφών με βελτιωμένα δομικά, φαρμακολογικά ή/και κινητικά χαρακτηριστικά.

B69. Skopelitou, K and N.E. Labrou (2010). A new colorimetric assay for glutathione transferase-catalyzed halogen ion release for high-throughput screening. Analytical Biochemistry, 405(2):201-6.

Στην εργασία αυτή περιγράφετε η ανάπτυξη μιας νέας χρωματομετρικής δοκιμής για τον προσδιορισμό της δράσης του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας αλογονοαλκ;ania. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στηρίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αλογόνου να υποκαθιστούν τα θειοκυανικά ανιόντα που ευρίσκονται συμπλοκοποιημένα με τα ιόντα του υδραργύρου. Τα ελεύθερα θειοκυανικά ανιόντα αντιδρούν ποσοτικά με ιόντα σιδήρου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου, το οποίο βρίσκεται σε αναλογία με την συγκέντρωση του αλογόνου που συμμετέχει στην αντίδραση. Το σύμπλοκο που προκύπτει έχει

χρώμα πορτοκαλή-κόκκινο και απορροφά στα 460 nm. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη των συνθηκών αντίδρασης και οριοθετήθηκαν οι συνθήκες για την εφαρμογή της μεθόδου. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο χρησιμοποιώντας καθαρό ένζυμο όσο και μη κατεργασμένο εκχύλισμα από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* σε 96-θέσεων πλάκες τύπου ELISA. Η μέθοδος επίσης εφαρμόστηκε για τη σάρωση μεταλλαγμένων μορφών GSTs από βιβλιοθήκη που πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της κατευθυνόμενης εξέλιξης.

B70. K. Benekos, C. Kissoudis, I. Nianiou-Obeidat, N.E. Labrou, P. Madesis, M. Kalamaki, A. Makris, A. Tsaftaris (2010). Over-expression of a specific soybean *GmGSTU4* isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants, J. Biotechnol. 150(1):195-201.

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού με το γονίδιο του ενζύμου *GmGSTU4*. Στην εργασία περιγράφεται ο μοριακός χαρακτηρισμός των τροποποιημένων φυτών και η επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων προκαλούμενων από ζιζανιοκτόνα στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυτών. Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός και δημιουργία διαγονιδιακών φυτών τα οποία χαρακτηρίστηκαν με PCR και υβριδισμό. Συγκριτικός έλεγχος του φαινοτύπου των μετασχηματισμένων και μη-μετασχηματισμένων φυτών έδειξε ότι τα μετασχηματισμένα φυτά εμφάνισαν σημαντικά καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερη αντοχή σε σχέση με τα μη-μετασχηματισμένα φυτά έναντι ζιζανιοκτόνων που ανήκουν στην ομάδα των diphenyl ether και chloroacetanilide.

B71. D. Tsikou, C. Stedel, E. D. Kouri, M.K. Udvardi, T.L. Wang, P. Katinakis, N.E. Labrou, E. Flemetakis (2011). Characterization of two novel nodule-enhanced α -type carbonic

anhydrases from *Lotus japonicus*. Biochim Biophys Acta (Proteins and Proteomics), 1814(4):496-504.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* και ο καθαρισμός δύο ισοενζύμων του α-τύπου αφυδατάσης των ανθρακικών (LjCAA1 and LjCAA2) από το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*. Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν κινητικά. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης τους δομής με ομόλογη μοντελοποίηση και προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση. Ο ρόλος των ενζύμων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας RT-PCR και τα αποτελέσματα συζητήθηκαν ως προς τον ρόλο των ενζύμων στην μεταβολισμό του CO₂.

B72. G.A. Kotzia, N.E. Labrou (2011). Engineering substrate specificity of *E. carotovora* L-asparaginase for the development of biosensor. J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 72, 95– 101.

Το ένζυμο L-ασπαραγινάση καταλύει τη μετατροπή της L-Asn σε L-Asp και σε μικρότερη έκταση τη μετατροπή της L-Gln σε L-Glu. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* 3937 με εφαρμογή κατευθυνόμενης εξέλιξης και στόχο τη δημιουργία νέων μορφών του ενζύμου με μειωμένη δράση γλουταμινάσης. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της περιορισμένης επιμήκυνσης χρησιμοποιώντας σαν αρχικές μήτρες τα γονίδια του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* 3937 και *Erwinia carotovora*. Μετά την επιλογή των μεταλλαγμένων μορφών απομονώθηκε μια νέα μορφή του ενζύμου που έφερε σημειακή μετάλλαξη. Η μορφή αυτή εμφάνισε μη-ανιχνεύσιμη δράση γλουταμινάσης. Η μορφή αυτή ακινητοποιήθηκε σε στερεό φορέα με εφαρμογή γλουταραλδεϋδης με στόχο την ανάπτυξη βιοαισθητήρα προσδιορισμού L-ασπαραγίνης σε φυτικά δείγματα. Η μέθοδος βασίζεται στη χρωματομετρική αντίδραση Nessler και παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα.

Ειδικότερα, σχεδιάστηκε πρότυπη καμπύλη γραμμικότητας στην περιοχή 0–100 μM για L-Asn. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε στην περιοχή $\pm 2\text{--}5\%$ και η ανάκτηση της L-Asn ήταν κατά μέσο όρο 102.1%.

B73. K. Skopelitou, A.W. Muleta, O. Pavli, G.N. Skaracis, E. Flemetakis, A.C. Papageorgiou and N.E. Labrou (2012). Overlapping protective roles for glutathione transferase gene family members in chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. Functional & Integrative Genomics 12(1):157-72.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση, έκφραση και χαρακτηρισμός της οικογένειας των ενζύμων τρανσφεράση της γλουταθειόνης από *Agrobacterium tumefaciens*. Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα χαρακτηρίστηκαν ως προς την εκλεκτικότητα έναντι μεγάλης ποικιλίας διαφορετικών υποστρωμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης τους δομής με ομόλογη μοντελοποίηση και προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση. Βιοϋπολογιστική και φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ανάμεσα στα διαφορετικά ισοένζυμα υπάρχουν μέλη που δεν ανήκουν στις γνωστές κλάσεις των GSTs και πιθανότατα ανήκουν σε νέες, μη-χαρακτηρισμένες κλάσεις. Τέλος, προσδιορίστηκε το πρότυπο έκφρασης των ενζύμων κάτω από διαφορετικές συνθήκες καταπονήσεων του *Agrobacterium tumefaciens* (επίδραση ηλεκτρονιόφιλων ξενοβιοτικών, οσμωτικής καταπόνησης, θερμική καταπόνηση). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαφορετικά ένζυμα έχουν επικαλυπτόμενους φυσιολογικούς ρόλους υπό την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων.

B74. E. Chronopoulou, P. Madesis, B. Asimakopoulou, D. Platis, A. Tsaftaris, N.E. Labrou (2012). Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 235, 1253-1269.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός τριών ισοενζύμων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από *Phaseolus vulgaris*. Τα ισοένζυμα αυτά εντοπίστηκαν με πρωτεωμική ανάλυση και καθαρίστηκαν χρωματογραφικά από φύλα *Phaseolus vulgaris* μετά από μεταχείριση του φυτού με το φυτοπροστατευτικό fluazifop-p-butyl. Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα χαρακτηρίστηκαν ως προς την εκλεκτικότητά τους έναντι μεγάλης ποικιλίας διαφορετικών ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα δύο από αυτά τα ισοένζυμα ανήκουν στην κλάση τ και ένα στην κλάση ϕ . Κινητική ανάλυση έδειξε ότι εμφανίζουν διαφορετικά καταλυτικά και κινητικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης τους δομής με ομόλογη μοντελοποίηση και προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση.

B75. Skopelitou K, Dhavala P, Papageorgiou AC, Labrou NE (2012). A Glutathione Transferase from *Agrobacterium tumefaciens* Reveals a Novel Class of Bacterial GST Superfamily. *PLoS ONE* 7(4): e34263.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε λεπτομερής κινητικός χαρακτηρισμός και δομικός χαρακτηρισμός του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης GSTH1-1 από *Agrobacterium tumefaciens* C58 με εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X και κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση. Το ένζυμο αυτό ανήκει σε μία νέα κλάση που εντοπίζεται αποκλειστικά σε βακτήρια. Προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή σαν σύμπλοκο με τον αναστολέα S-νιτροβενζυλ-GSH (1,4 Å) και μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση

του υποστρώματος. Στην εργασία προτείνεται ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης του ενζύμου και επιβεβαιώθηκαν με πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης. Ειδικότερα, το αμινοξικό κατάλοιπο Arg34 σε συνδυασμό με ένα σύστημα δικτύου ηλεκτρονίων και μορίων νερού αποτελούν τη βάση του καταλυτικού μηχανισμού. Τα αμινοξικά κατάλοιπα Phe22, Ser25 και Arg187 αποτελούν σημαντικά δομικά στοιχεία που καθορίζουν την καταλυτική αποτελεσματικότητα και την εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα.

B76. E. Chronopoulou, A.C. Papageorgiou, A. Markoglou and N.E. Labrou (2012). Inhibition of human glutathione transferases by pesticides: Development of a simple analytical assay for the quantification of pesticides in water. J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 81, 43–51.

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου GST από ξενοβιοτικές ενώσεις (π.χ. φυτοπροστατευτικά) μπορεί να παρέχει ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης της ξενοβιοτικής ένωσης χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την αντίδραση CDNB/GSH. Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η ανάπτυξη μιας νέας δοκιμής για τον προσδιορισμό των εντομοκτόνων dieldrin και spiromesifen. Πραγματοποιήθηκε σάρωση ποικιλίας διαφορετικών ισoenζύμων του ανθρώπου και βρέθηκε ότι isoένζυμο hGSTA1-1 αναστέλλεται αποτελεσματικά από τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen. Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη και βιοϋπολογιστική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των dieldrin και spiromesifen με το isoένζυμο hGSTA1-1. Η μελέτη έδειξε ότι το dieldrin και spiromesifen αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με το ένζυμο και αλληλεπικαλύπτουν την G- και H-θέση στο ένζυμο. Οι σταθερές αλληλεπίδρασης προσδιορίστηκαν IC_{50} $17.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ και $12.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$ για το dieldrin και spiromesifen, αντίστοιχα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα και έδειξε υψηλή συμφωνία με την καθιερωμένη μέθοδο που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης HPLC. Καμπύλες γραμμικότητας σχεδιάστηκαν στην περιοχή 0–10 μM . Η επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε 4.1% (N = 28).

B77. G.E. Koutsoumpli, V.D. Dimaki, T.N. Thireou, E.E. Eliopoulos, N.E. Labrou, G.I. Varvounis and Y.D. Clonis (2012). Synthesis and study of 2-(pyrrolesulfonylmethyl)-N-arylimines: a new class of inhibitors for human glutathione transferase A1-1. J. Med. Chem. 55(15):6802-13.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση 11 πυρολικών αναλόγων σαν αναστολείς του ενζύμου hGSTA1-1 ξεκινώντας από την πρόδρομη ένωση: 1-methyl-2-[(2-nitrobenzylsulfanyl]-1H-pyrrole. Μοριακή μοντελοποίηση έδειξε την ύπαρξη δύο περιοχών στη Η-θέση του ενζύμου: την καταλυτική στην οποία μπορούν να δεσμεύονται μικρά και μεγάλα πυρολικά ανάλογα και μία δεύτερη περιοχή που δεσμεύονται μόνο μικρότερα ανάλογα. Το ανάλογο 9, παρουσίασε την υψηλότερη ικανότητα αναστολής ($K_{i9} = 71 \pm 4 \mu\text{M}$). Αλληλεπιδρά με το ένζυμο συναγωνιστικά έναντι του CDNB. Το ανάλογο 4 δεσμεύεται ($K_{i4} = 135 \pm 27 \mu\text{M}$) και στις δύο περιοχές και επιτρέπει τη δέσμευση ενός δεύτερου μορίου (ανάλογο 4 ή CDNB) το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό μη-δραστικών ή δραστικών συμπλόκων, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η δομική ομάδα του πυρολίου αποτελεί ένα νέο φαρμακοφόρο για το ένζυμο hGSTA1-1 και το ανάλογο 9 μπορεί να αποτελέσει ένα νέο μόριο οδηγό.

B78. M. Karpusas, I. Axarli, L. Chiniadis, A. Papakyriakou, K. Bethanis, K. Scopelitou, Y.D. Clonis and N.E. Labrou (2013). The interaction of the chemotherapeutic drug chlorambucil with human glutathione transferase A1-1: kinetic and structural analysis. PLoS ONE, <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056337>.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης του ισοενζύμου hGSTA1-1 με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο chlorambucil χρησιμοποιώντας κινητική ανάλυση,

βιοϋπολογιστική και κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία γλουταθειόνης η chlorambucil λειτουργεί σαν υπόστρωμα του ενζύμου. Απουσία γλουταθειόνης λειτουργεί σαν μη-αντιστρεπτός αναστολέας και αλκυλιώνει την Cys112 που εντοπίζεται στην είσοδο της Η-θέσης. Προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή σαν σύμπλοκο με τον αναστολέα chlorambucil-GSH (2.1 Å) και μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του chlorambucil από το ένζυμο. Τα δομικά αποτελέσματα συμπληρώθηκαν με μελέτη της μοριακής δυναμικής του ενζύμου τα οποία έδειξαν ότι σε μοριακό επίπεδο η δομική ευελιξία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επίτευξη της καταλυτικής λειτουργίας.

B79. O. Zoi, T.N. Thireou, V. Rinotas, P.G. Tsoungas, E.E. Eliopoulos, E. Douni, N.E. Labrou & Y.D. Clonis (2013). Designer xanthone: an inhibitor scaffold for human glutathione transferase isoenzyme A1-1. J. Biomol. Screen., 18, 1092 - 1102.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ανάλογα ξανθόνης σαν αναστολείς του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης hGSTA1-1. Σάρωση 18 αναλόγων ξανθόνης έδειξε τρία ανάλογα (7, 8, 17) με υψηλή ικανότητα αναστολής (>85%) και χαμηλές τιμές IC₅₀ (7: 1.59 ± 0.25 μM, 8: 5.30 ± 0.30 μM, και 17: 8.56 ± 0.14 μM). Κινητική ανάλυση έδειξε ότι τα ανάλογα αυτά αλληλεπιδρούν συναγωνιστικά έναντι του CDNB (K_{i7} = 0.76 ± 0.18 and K_{i17} = 1.69 ± 0.08 μM). Το ανάλογο 17 αναστέλλει το ένζυμο hGSTA1-1 *in vitro* σε εκχύλισμα καρκινικών κυττάρων (IC₅₀ = 10.54 ± 2.41 μM). Επιπλέον, και τα τρία ανάλογα (7, 8, 17) ήταν κυτταροτοξικά (Caco-2). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η δομική ομάδα της ξανθόνης αποτελεί ένα νέο φαρμακοφόρο για το ένζυμο hGSTA1-1 και το ανάλογο 17 μπορεί να αποτελέσει ένα μόριο οδηγό για την ανάπτυξη νέων αναστολέων του ενζύμου.

B80. K. Skopelitou, N. Georgakis, R. Efroze, E. Flemetakis and N.E. Labrou (2013) Sol-gel immobilization of haloalkane dehalogenase from *Bradyrhizobium japonicum* for the remediation 1,2-dibromoethane. J. Mol. Cat. B: Enzymatic 97, 5–11.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται μία νέα μέθοδος ακινητοποίησης του ενζύμου απαλογονάση των αλκυλαλογονιδίων από το βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Οι απαλογονάσες αποτελούν ομάδα των α/β-υδρολασών βακτηριακής προέλευσης, που σκοπό έχουν τη μετατροπή αλογονωμένων ενώσεων στις αντίστοιχες αλκοόλες και υδραλογόνα. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), καθарίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακινητοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τεχνολογία sol-gel (τετρα-αιθυλοσιλικικό παράγωγο). Το ακινητοποιημένο ένζυμο χαρακτηρίστηκε κινητικά και προσδιορίστηκε η δομική του σταθερότητα. Το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα στους 4 °C και 25 °C, συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο. Το ακινητοποιημένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αντιδραστήρα με στόχο την αποικοδόμηση του 1,2-διβρωμοαιθανίου από υδατικά διαλύματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι ικανό να υδρολύει το 91.8% του παρεχόμενου 1,2-διβρωμοαιθανίου μέσα σε 16.7 h.

B81. G. Kotzia and N.E. Labrou (2013). Structural and functional role of Gly281 in L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Prot & Pept Letters, 20(12):1302-7.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος του συντηρημένου αμινοξικού κατάλοιπου Gly281 του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia carotovora*. Η μεταλλαγμένη μορφή Gly281Ser του ενζύμου εκφράστηκε και καθарίστηκε. Κινητική ανάλυση έδειξε ότι εμφανίζει 10.8-φορές αυξημένη K_m και 45.5-φορές μειωμένη καταλυτική δράση έναντι της L-Asn. Μελέτη της επίδρασης του pH στην V_{max} και V_{max}/K_m έδειξε ότι η μεταλλαγμένη μορφή εμφανίζει

τροποποιημένες οξεοβασικές ιδιότητες. Μελέτη της δομικής σταθερότητας έδειξε ότι η μεταλλαγμένη μορφή εμφανίζει υψηλότερη θερμοσταθερότητα (3.8°C). Βιοϋπολογιστική μελέτη της τρισδιάστατης δομής έδειξε ότι η μετάλλαξη αν και βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση από το ενεργό κέντρο επηρεάζει έμμεσα τόσο την αρχιτεκτονική του όσο και τη δυναμική του μορίου.

B82. A. Maltezos, D. Platis, D. Vlachakis, S. Kossida, M. Marinou and N.E. Labrou (2014) Design, Synthesis and Application of Benzyl-sulphonate Biomimetic Affinity Adsorbents for Monoclonal Antibody Purification from Transgenic Corn. J. Mol. Recognition, 27, 19–31.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε βιβλιοθήκη δεσμευτών συγγένειας και αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα της να προσροφά και να καθαρίζει το ανασυνδυασμένο mAb anti-HIV 2G12 που εκφράζεται σε διαγονιδιακό καλαμπόκι. Οι δεσμευτές ήταν δομικά ανάλογα της χρωστικής Cibacron Blue 3GA (CB3GA). Ένας δεσμευτής (4ABS-Trz-4ABS) με υποκαταστάτη το 4-aminobenzyl sulfonic acid (ABS) συνδεδεμένος στο δακτύλιο της τριαζίνης (Trz) έδειξε υψηλή συγγένεια με το mAb 2G12. Πραγματοποιήθηκε μελέτη του μηχανισμού προσρόφησης και μοριακή μελέτη μοντελοποίησης και μοριακής δυναμικής ώστε να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση του δεσμευτή με το mAb 2G12. Ο προσροφητής αυτός χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη κατιούσας επεξεργασίας για τον χρωματογραφικό του καθαρισμό του mAb anti-HIV 2G12 από καλαμπόκι. Η διαδικασία περιλάμβανε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε S-Sepharose FF και σε δεύτερο στάδιο χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή 4ABS-Trz-4ABS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία αυτή αποδίδει αντίσωμα ικανοποιητικής καθαρότητας, κατάλληλο για την ανάπτυξη αναλυτικών εφαρμογών.

B83. E. Chronopoulou, P. Madesis, A.Tsaftaris, N. E. Labrou (2014). Cloning and characterization of a biotic stress inducible glutathione transferase from *Phaseolus vulgaris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2):595-609.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και μελέτη του ισοενζύμου PvGSTU3-3 από *Phaseolus vulgaris*. Το ένζυμο υπερεκφράζεται κάτω από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης του *Phaseolus vulgaris* (επίδραση *Uromyces appendiculatus*). Το cDNA κλωνοποιήθηκε με RACE-RT και εκφράστηκε σε *E. coli*. Το ετερόλογο ένζυμο μελετήθηκε κινητικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο PvGSTU3-3 εμφανίζει ευρεία εκλεκτικότητα και υψηλή συγγένεια με τη GSH (10-φορές μικρότερη K_m). Εκδηλώνει υψηλή καταλυτική δράση έναντι ισοθειοκυανικών αναλόγων και πιθανότατα ρυθμίζει την παραγωγή τους σαν αποτέλεσμα των βιοτικών καταπονήσεων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της τρισδιάστατης του δομής με ομόλογη μοντελοποίηση και προβλέφθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στον καταλυτικό μηχανισμό και μοριακή αναγνώριση.

B84. K. Skopelitou, A. Muleta, A. Papageorgiou, O. Pavli, E. Flemetakis, E. Chronopoulou, G. Skaracis, N.E. Labrou (2014) Comparative analysis of the structural and functional features of two homologous tau class glutathione transferases from *Glycine max*, (submitted).

Στην εργασία αυτή περιγράφεται συγκριτική μελέτη δύο ισοενζύμων της τάξης τ από σόγια. Τα δύο ισοένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* διαθέτουν υψηλή ομολογία (88.9 %). Τα αντίστοιχα τους γονίδια διαθέτουν παρόμοια δομή. Μελέτη της έκφρασης με RT-PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι τα γονίδια εκφράζονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Κινητική μελέτη έδειξε ότι τα ισοένζυμα *GmGSTU2-2* και *GmGSTU10-10* δείχνουν μεγάλες διαφορές στην εκλεκτικότητα και στον καταλυτικό μηχανισμό. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου *GmGSTU10-10*

καθορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (1.6 Å) σαν σύμπλοκο με S-hydroxyglutathione. Συγκριτική μελέτη της δομής του GmGSTU10-10 με το μοντέλο της δομής του ισοενζύμου GmGSTU2-2 έδειξε ότι διαθέτουν παρόμοια αναδίπλωση με διαφορές που εντοπίζονται κυρίως στην διαμόρφωση της έλικας H4 και H9.

B85. C. Karamitros, N.E. Labrou (2014) Extracellular expression and affinity purification of L-asparaginase from *E. chrysanthemi* in *E. coli*, (submitted).

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η εξωκυττάρια έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *E. chrysanthemi* χρησιμοποιώντας ως ξενιστή την *E. coli*. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες το φυσικό ένζυμο από *E. chrysanthemi* εκφράζεται στο εξωκυττάριο μέσο από *E. coli* Rosetta(DE3) με μεγάλη απόδοση. Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε απευθείας από το μέσο χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητές με ακινητοποιημένα L-Asn, L-Asp and L-Gln. Ο προσροφητής με ακινητοποιημένη L-Asp (L-Asp-Sepharose CL 6B) έδειξε την υψηλότερη ικανότητα καθαρισμού και χωρητικότητα. Μελέτη του μηχανισμού προσρόφησης έδειξε ότι ακολουθεί το μηχανισμό της ισοθέρμου Langmuir ($K_D = 0.21 \mu\text{M}$) με μέγιστη χωρητικότητα 4.7 mg/g υγρού προσροφητή.

Άρθρα δημοσιευμένα μετά από επιστημονική κρίση σε περιοδικά που δεν περιλαμβάνονται στο Science Citation Index.

B86. E. Chronopoulou and N.E. Labrou (2009). Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology. Recent Patents in Biotechnology 3(3):211-23.

Το άρθρο αυτό αποτελεί βιβλιογραφική ανασκόπηση της οικογένειας των ενζύμων τρανφεράση της γλουταθειόνης. Περιγράφονται τα δομικά και κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Παρουσιάζεται λεπτομερώς η εκλεκτικότητα και καταλυτική δράση τους έναντι ποικιλίας υποστρωμάτων. Επίσης δίνεται έμφαση στις εφαρμογές του ενζύμου στα πεδία της βιοτεχνολογίας φυτών και την βιοιατρική τεχνολογία σα μοριακό στόχο στη θεραπεία του καρκίνου. Έμφαση δίνεται σε σχετικά διπλώματα ευρεσιτεχνίας που έχουν εγκριθεί και αφορούν την εμπορική εκμετάλλευση των εφαρμογών του ενζύμου.

B87. I. Axarli, N.E. Labrou (2010). Directed Evolution of Cytochrome P450 CYP102A2 from *Bacillus subtilis*. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology, 4, (1), 19-24.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο ανασχεδιασμός της εκλεκτικότητας του ενζύμου P450 CYP102A2 από *Bacillus subtilis*. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της τυχαίας μεταλλαξογένεσης με PCR. Αρχικός έλεγχος μεγάλου αριθμού μεταλλαγμένων μορφών οδήγησε στην επιλογή και ταυτοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής Pro15Ser/Phe160Leu. Η μορφή αυτή μελετήθηκε έναντι διαφόρων υποστρωμάτων όπως SDS, λαυρικό οξύ, 1,4-ναφθοκινόνη, εθακρυνικό οξύ και αμινοκαπροϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή Pro15Ser/Phe160Leu εμφανίζει υψηλότερη ειδική δραστηριότητα συγκριτικά με τον άγριο τύπο του ενζύμου έναντι της 1,4-ναφθοκινόνης. Σχεδιασμός του μοντέλου της τρισδιάστατης δομής με ομόλογη μοντελοποίηση έδειξε ότι η μετάλλαξη Phe160Leu βρίσκεται στην α-έλικα 6 και αλληλεπιδρά με αμινοξικά κατάλοιπα της α-έλικα 10 η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό της περιοχής δέσμευσης των υποστρωμάτων.

B88. I. Axarli, A. Prigipaki and N.E. Labrou (2010). Cytochrome P450 CYP102A2 catalyzes efficient oxidation of sodium dodecyl sulphate: a molecular tool for remediation. Enzyme Research, Volume 2010, Article ID 125429, 7 pages.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μελέτη του ενζύμου CYP102A2 από *B. Subtilis* δίνοντας έμφαση στην αντίδραση που καταλύει χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το θειικό δωδεκανοϊκό νάτριο (SDS). Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του SDS και NADPH στην ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του pH στην ταχύτητα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο εμφανίζει βέλτιστο pH 7.2. Η καμπύλη pH- V_{max} εμφανίζει δύο σημεία καμπής που αντιστοιχούν σε $pK_a = 6.7 \pm 0.08$ και $pK_a = 7.3 \pm 0.06$.

B89. E. Chronopoulou, I. Axarli, I. Nianiou-Obeidat, P. Madesis, A. Tsaftaris, and N. Labrou (2011). Structure and antioxidant catalytic function of plant glutathione transferases. Current Chemical Biology, 5, 64-74.

Το άρθρο αυτό αποτελεί βιβλιογραφική ανασκόπηση της οικογένειας των ενζύμων τρανφεράση της γλουταθειόνης από φυτά. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον ρόλο του ενζύμου σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και μελετάται η δράση του ενζύμου σαν περοξειδάση της γλουταθειόνης. Παρουσιάζεται λεπτομερώς η εκλεκτικότητα και καταλυτική δράση τους έναντι ποικιλίας υποστρωμάτων και ο ρόλος και η συνεισφορά της δράσης των ενζύμων αυτών στον μηχανισμό προστασίας και ρύθμισης της λειτουργίας του κυττάρου από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

Γ. Κεφάλαια δημοσιευμένα σε βιβλία.

Γ1. N.E. Labrou and Y.D. Clonis (1999). The tachykinin family of peptides and their receptors. In Matsoukas J. & Mavromoustakos (Eds), 'Bioactive Peptides in Drug Discovery and Design: Medical Aspects'. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands. 225-233.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Bioactive Peptides in Drug Discovery and Design: Medical Aspects*' γίνεται περιγραφή της δομής και δράσης του συστήματος των ταχυκινίνων. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο νευροπεπτίδιο νευροκινίνη Α και τον αντίστοιχο υποδοχέα του.

Γ2. N.E. Labrou (2000). Dye-ligand affinity chromatography for protein separation and purification. In: Bailon, P., Ehrlich, G., Fung, W.-J., Berthold, W., (Eds), *Methods in Molecular Biology: 'Affinity Chromatography: Methods and Protocols'*. Humana Press, USA, 129-139.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Affinity Chromatography: Methods and Protocols*' γίνεται αναλυτική παρουσίαση των μεθόδων και υλικών της χρωματογραφίας συγγένειας σε ακινητοποιημένες χρωστικές. Επιπλέον, δίνεται αναλυτική περιγραφή των πρωτόκολλων που αφορούν τη σύνθεση, καθαρισμό και ακινητοποίηση βιομιμητικών χρωστικών.

Γ3. N.E. Labrou and Y.D. Clonis. Immobilised synthetic dyes in affinity chromatography. In: Vijayalakshmi, M.A. (Ed.), *Theory and Practice of Biochromatography*. Harwood Academic Publishers, Netherlands, 235-251.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Theory and Practice of Biochromatography*' περιγράφονται οι αρχές της χρωματογραφίας συγγένειας σε ακινητοποιημένες χρωστικές. Γίνεται παρουσίαση της

δομής, χημείας και σύνθεσης των τραζινο-χρωστικών και σύντομη ανασκόπηση των εφαρμογών τους στον καθαρισμό ενζύμων και πρωτεϊνών.

Γ4. N.E. Labrou. Affinity Chromatography. In Gupta, M. N. (Ed.), Methods for Affinity-Based Separations Of Enzymes and Proteins. Birkhauser Verlag AG, Switzerland, 16-28.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται περιγραφή νέων ή βελτιωμένων μεθόδων και πρωτόκολλων που χρησιμοποιούνται στο σχεδιασμό και ακινητοποίηση δεσμευτών οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή στη χρωματογραφία συγγένειας.

Γ5. N.E. Labrou (2004). Dye-ligand Affinity Chromatography in Proteomic Research. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 275-299.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, γίνεται αναλυτική παρουσίαση των μεθόδων και υλικών της χρωματογραφίας συγγένειας με ακινητοποιημένες χρωστικές. Περιγράφονται πρωτόκολλα καθαρισμού ενζύμων και πρωτεϊνών και συζητούνται εφαρμογές στην πρωτεομική ανάλυση.

Γ6. N.E. Labrou, K. Mazitsos and Y. Clonis (2005). Dye-ligand and Biomimetic Affinity Chromatography. In D.S. Hage (Ed.), Handbook of Affinity Chromatography. Marcel Dekker, Inc, New York, pp231-255.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Handbook of Affinity Chromatography* γίνεται ανασκόπηση των μεθόδων σχεδιασμού και επιλογής βιομιμητικών μορίων με εφαρμογή στη χρωματογραφία

συγγένειας. Επιπλέον, περιγράφονται μέσα από παραδείγματα, εφαρμογές προσροφητών συγγένειας στον καθαρισμό ενζύμων και πρωτεϊνών.

Γ7. G.A. Kotzia, I.A. Axarli, and N.E. Labrou (2005). Evolutionary Methods in Enzyme Technology: High-Throughput Screening and Selection of New Enzyme Variants, In Pandalai, S.G. (Ed): Resent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering Vol 7, Research Signpost, pp. 85-104.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Resent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering* γίνεται συνοπτική παρουσίαση των μοντέρνων μεθόδων υψηλής ρυθμαπόδοσης με στόχο την αποτελεσματική επιλογή νέων ενζυμικών μορφών που προκύπτουν από προσεγγίσεις κατευθυνόμενης εξέλιξης. Επιπλέον, περιγράφονται παραδείγματα επιτυχημένης εφαρμογής των μεθόδων αυτών στην επιλογή ενζυμικών μορφών υψηλης προστιθέμενης αξίας.

Γ8. Platis, D., Kotzia, G. A., Axarli, I. A. and Labrou, N.E. (2006). Enzyme Engineering and Technology, In Hui Y.H. (Ed) Food Biochemistry and Food Processing, Blackwell Publishing Company USA, pp175-223.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Food Biochemistry and Food Processing* γίνεται συνοπτική παρουσίαση των δομικών και κινητικών χαρακτηριστικών των ενζύμων και επιπλέον παρουσιάζονται μοντέρνες μέθοδοι και τεχνικές ετερόλογης έκφρασης ενζύμων, ενζυμικής μηχανικής και τεχνολογίας.

Γ9. K. Skopelitou, D. Platis, I. Axarli and N.E. Labrou (2009) Glutathione transferases in drug discovery and development: towards safer and efficacious drugs, In: "Frontiers in Drug, Design and Discovery ", Bentham Science Publishers, Vol 4, pp. 23-42.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου "Frontiers in Drug, Design and Discovery " γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση της οικογένειας των ισοενζύμων τρανφεράση της γλουταθειόνης από άνθρωπο. Παρουσιάζεται λεπτομερώς η εκλεκτικότητα και η καταλυτική δράση που εκδηλώνουν έναντι ποικιλίας υποστρωμάτων. Επίσης, παρουσιάζεται ο ρόλος τους και η εφαρμογή των ενζύμων αυτών σε μοριακό στόχο σχεδιασμού νέων φαρμάκων.

Γ10. D. Platis and N. Labrou (2010) Downstream Processing Strategies for the Purification of Recombinant Proteins from Transgenic Maize. Chromatographic Evaluation of the Affinity Ligand 4-Amino-phenyl-oxanilic. In: *Agriculture Research and Technology*, Editors: Kristian Bundgaard and Luke Isaksen. Nova Publishers, USA, Chapter 13, 397-416.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Agriculture Research and Technology*' γίνεται παρουσίαση ενός χρωματογραφικού πρωτοκόλλου που βασίζεται στον προσροφητή με ακινητοποιημένο το μόριο 4-αμινο-βενζυλ-οξανυλικό οξύ. Ο προσροφητής αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητα του να καθαρίζει πρωτεΐνες από διογονιδιακό καλαμπόκι.

Γ11. G. Mavridis and N.E. Labrou (2010) The interaction of the prion protein with triazine-based biomimetic affinity ligands, In: *Biopharmaceutics and Drug Hypersensitivity*, Editors: Paul Mossillo and John Pinzini. Nova Publishers, USA, 177-190.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *‘Biopharmaceutics and Drug Hypersensitivity’* παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση μιας ομάδας βιομημητικών δεσμευτών συνδεδεμένων στο δακτύλιο της τριαζίνης με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη prion. Στόχος της εργασίας ήταν η εύρεση κατάλληλων δεσμευτών ικανών να δεσμεύουν εκλεκτικά την πρωτεΐνη.

Γ12. K. Lappa, G.A. Kotzia and N.E. Labrou (2010) Studies on the thermal stability of the therapeutic enzyme L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. In: *Biochemistry and Histochemistry Research Developments*, Editors: Stefan Fuchs and Max Auer, Nova Publishers, USA, Chapter 13, 323-334.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *‘Biochemistry and Histochemistry Research Developments’* παρουσιάζεται η θερμοδυναμική μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia carotovora*. Το ένζυμο L-ασπαραγινάση καταλύει την μετατροπή της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαραγινικό και αμμωνία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την θεραπεία αιμοποιητικών ασθενειών όπως οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και λεμφωμάτων. Η μελέτη περιλάμβανε τον προσδιορισμό βασικών θερμοδυναμικών σταθερών.

Γ13. E. Chronopoulou, N.E. Labrou (2011). Site-saturation Mutagenesis: a powerful tool for structure-based design of combinatorial mutation libraries. In: *Current Protocols in Protein Science*, Editor: Ben Dunn, John Wiley & Sons, Chapter 26:Unit26.6:26.6.1-26.6.10.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *‘Current Protocols in Protein Science’* δίνεται αναλυτική περιγραφή της στρατηγικής και του βασικού πρωτοκόλλου που εφαρμόζεται για το σχεδιασμό συνδυαστικών βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων μορφών ενζύμων και πρωτεϊνών με μεταλλαξογένεση κορεσμού. Δίνονται παραδείγματα, περιγράφονται προβλήματα και επιτυχημένες εφαρμογές.

Γ14. Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E., Karamitros, C., Labrou, N.E. (2012). Biocatalysis, Enzyme Engineering and Enzyme Biotechnology, In: Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition. Editors: Benjamin Simpson, Leo Nollet, Gopinadhan Paliyath and Soottawat Benjakul. John Wiley & Sons, Inc., Chapter 7, pp. 125-165.

Το κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Food Biochemistry and Food Processing* αποτελεί αναθεωρημένη έκδοση του κεφαλαίου Γ8 για την δεύτερη έκδοση του βιβλίου. Γίνεται συνοπτική παρουσίαση των δομικών και κινητικών χαρακτηριστικών των ενζύμων και επιπλέον παρουσιάζονται μοντέρνες μέθοδοι ετερόλογης έκφρασης ενζύμων, ενζυμικής μηχανικής και ενζυμικής τεχνολογίας.

Γ15. N.E. Labrou (2013). Clostripain. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Editors: Neil Rawlings and Guy Salvesen, Oxford: Academic Press, Elsevier, Chapter 521, pp. 2323 - 2327.

Το κεφάλαιο αυτό του βιβλίου *Handbook of Proteolytic Enzymes* αποτελεί αναθεωρημένη έκδοση του αρχικού κεφαλαίου για την νεότερη έκδοση του βιβλίου. Παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση του πρωτεολυτικού ενζύμου clostripain και περιγράφονται κυρίως τα δομικά και κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου.

Γ16. E. Chronopoulou, M. Chatzikonstantinou, P. Madesis, I. Nianiou-Obeidat and N.E. Labrou (2013). Structure, function and catalytic properties of human glutathione transferase P1-1. In: *Glutathione, structure, function and biotechnological implications*, Editors: N.E.Labrou & E. Flietakis, Nova Publishers, USA, Chapter 9, 187-198.

Το κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Glutathione, structure, function and biotechnological implications*' παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης P1-1 από

άνθρωπο. Περιγράφονται με λεπτομέρεια τα δομικά και κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Επίσης δίνεται έμφαση του ρόλου του ενζύμου στη θεραπεία του καρκίνου.

Γ17. P. Madesis, I. Nianiou-Obeidat, N.E. Labrou, A. Tsaftaris, (2013). The Use of Highly Specific GSTs towards the Development of Stress Tolerant Transgenic Plants. In: *Glutathione, structure, function and biotechnological implications*, Editors: N.E.Labrou & E. Flemetakis, Nova Publishers, USA, Chapter 14, 263-274.

Το κεφάλαιο αυτό του βιβλίου '*Glutathione, structure, function and biotechnological implications*' παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των ισοενζύμων τρανφεράση της γλουταθειόνης από φυτά. Περιγράφονται εφαρμογές των φυτικών ενζύμων στην ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών με νέα χαρακτηριστικά όπως η αντοχή στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

Γ18. Y.D. Clonis and N.E. Labrou (2013), Affinity Separation, Dye Ligands, In: Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, ISBN: 978-0-12-409547-2.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των αρχών και εφαρμογών της χρωματογραφίας συγγενείας σε ακινητοποιημένες χρωστικές. Γίνεται παρουσίαση της δομής και χημείας των τραζινο-χρωστικών και ανασκόπηση των εφαρμογών τους στον καθαρισμό ενζύμων και πρωτεϊνών. Το κεφάλαιο αποτελεί αναθεώρηση προηγούμενης έκδοσης.

Γ19. N.E. Labrou (2014) Protein Downstream Processing: an overview. In: Methods in Molecular Biology, *Protein downstream processing*, Springer USA, Editor: N.E.Labrou, Chapter 1, Vol 1129, 3-10.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου ‘Methods in Molecular Biology, Protein downstream processing’ γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση του πεδίου της κατιούσας επεξεργασίας πρωτεϊνών. Γίνεται παρουσίαση των σύγχρονων τάσεων και περιγράφονται μελλοντικοί στόχοι ανάπτυξης του πεδίου.

Γ19. E. Chronopoulou N.E. Labrou (2014) Synthesis and application of dye-ligand affinity adsorbents. In: Methods in Molecular Biology, Protein downstream processing, Springer USA, Editor: N.E.Labrou, Chapter 21, Vol 1129, 263-76.

Στο κεφάλαιο αυτό του βιβλίου ‘Methods in Molecular Biology, Protein downstream processing’ γίνεται αναλυτική παρουσίαση των μεθόδων και υλικών της χρωματογραφίας συγγένειας σε ακινητοποιημένες χρωστικές. Επιπλέον, δίνεται αναλυτική περιγραφή των πρωτόκολλων που αφορούν τη σύνθεση, καθαρισμό και ακινητοποίηση τριαζινο-χρωστικών με έμφαση στην Cibacron Blue 3GA. Τέλος, παρουσιάζεται πρωτότυπο πρωτόκολλο καθαρισμού ισοενζύμων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από φυτικές πηγές σε στήλη Cibacron Blue 3GA-Sepharose.