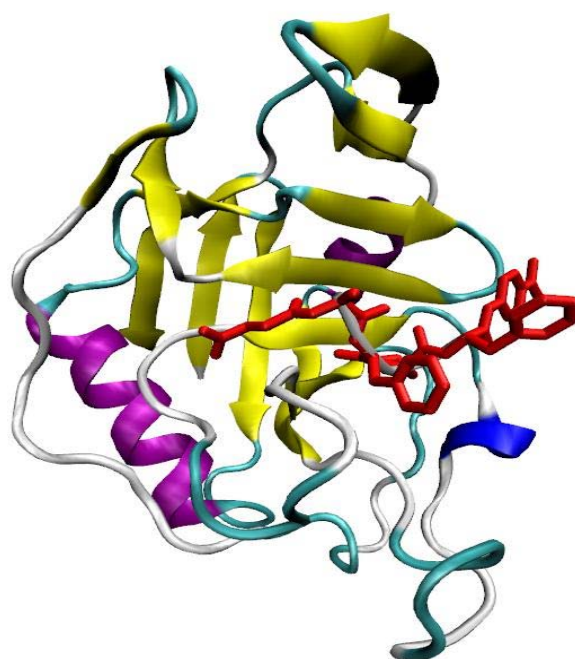




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Κρυσταλλογραφική μελέτη δομής και λειτουργίας των κυκλοφιλινών και μελέτη εγκλεισμού φυσικών προϊόντων σε κυκλοδεξτρίνες»

ΗΛΙΑΣ Δ. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Κωνσταντίνος Μπεθάνης

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Κρυσταλλογραφική μελέτη δομής και λειτουργίας των κυκλοφιλινών και μελέτη
εγκλεισμού φυσικών προϊόντων σε κυκλοδεξτρίνες»

ΗΛΙΑΣ Δ. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ
Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Κωνσταντίνος Μπεθάνης

ΑΘΗΝΑ 2013

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Κρυσταλλογραφική μελέτη δομής και λειτουργίας των κυκλοφιλινών και μελέτη εγκλεισμού φυσικών προϊόντων σε κυκλοδεξτρίνες»

του ΗΛΙΑ Δ. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗ
Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Κωνσταντίνος Μπεθάνης

Μέλη τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης:

- 1) Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Φυσικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)
- 2) Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μέλος)
- 3) Μιχαήλ Καρπούζας, Αναπληρωτής καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Φυσικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μέλος)

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής :

- 1) Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Φυσικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2) Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3) Μιχαήλ Καρπούζας, Αναπληρωτής καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Φυσικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 4) Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 5) Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 6) Κωνσταντίνα Γιαννακοπούλου, Ερευνήτρια Α, Ινστιτούτο Φυτικοχημείας, Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
- 7) Νικόλαος Λάμπρου, Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Περίληψη

Στη διατριβή αυτή, παρουσιάζεται η κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες-X μεγάλων και μικρο-μεσαίων βιομορίων και συμπλόκων τους.

Στο πρώτο μέρος, παρουσιάζεται η κρυσταλλογραφική μελέτη της δομής του ενζύμου της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης-A από το αζωτοβακτήριο *Azotobacter vinelandii* (AvCyPA ή AvPPIB). Οι κυκλοφιλίνες ανήκουν σε μια κατηγορία ισομερασών προλίνης (PPIases), που καταλύουν την *cis-trans* ισομερίωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται του κατάλοιπου της προλίνης σε πρωτεϊνικά υποστρώματα. Πέρα από την ισομερίωση, η οποία επιταχύνει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, οι κυκλοφιλίνες εμπλέκονται σε λειτουργίες όπως η ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών, η μεταγωγή σήματος, η διακίνηση πρωτεϊνών και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλοφιλίνες είναι ένζυμα μεγάλου βιολογικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, αφού η πρόσδεση τους στην κυκλοσπορίνη-A (CsA) μετριάξει τις ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις, που προκαλούνται μετά από μεταμόσχευση οργάνων. Μια άλλη σημαντική δράση είναι η πρόσδεση της κυκλοφιλίνης στην CA πρωτεΐνη του ιού HIV-1, που διευκολύνει την αντιγραφή του ιού. Η επίλυση δομών κυκλοφιλίνης από ένα ευρύ φάσμα οργανισμών έχει δείξει πως η πρωτεΐνη υιοθετεί δομή β-βαρελιού αποτελούμενου από οκτώ αντιπαράλληλους β-κλώνους, που περιέχουν μια θέση πρόσδεσης πεπτιδίου και περιβάλλονται από βρόχους που χαρακτηρίζονται από υψηλή κινητικότητα. Δομές κυκλοφιλινών δεσμευμένες με πεπτίδια προλίνης στην *cis*- ή *trans*- μορφή τους παρέχουν στιγμιότυπα του ενζυμικού μηχανισμού.

Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου της AvCyPA προσδιορίστηκε σε διακριτότητα 2.2 Å, ενώ η κρυσταλλική δομή της σε σύμπλοκο με το συνθετικό τετραπεπτίδιο ηλεκτρώλο – Αλανίνη – Φαινυλαλανίνη – Προλίνη – Φαινυλαλανίνη – p – νιτροανιλίδιο (succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-p-nitroanilide, suc-AFPF-pNA) σε 2 Å. Η προλίνη του πεπτιδίου υιοθετεί την *cis* διαμόρφωση. Η σύγκριση μεταξύ της ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής, καθώς και αντίστοιχων μορφών του ενζύμου από άλλες πηγές, παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την ποικιλομορφία της

διαμόρφωσης του ενζύμου, τις επιδράσεις που προκαλεί η πρόσδεση του πεπτιδίου στην συνολική δομή και τις αλληλεπιδράσεις δομής και λειτουργίας του ενζύμου.

Τέλος, σχεδιάστηκαν σημειακές μεταλλάξεις εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου προκειμένου να μελετηθεί ο νέος τρόπος διευθέτησης των αμινοξέων του ενεργού κέντρου, που επέρχεται με την μετάλλαξη. Ωστόσο, τα μεταλλάγματα $AnPPIB_{A84S}$, $AnPPIB_{A84T}$ και $AnPPIB_{M49A}$ δεν βρέθηκε να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην δράση ισομεράσης σε σχέση με την φυσική πρωτεΐνη.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής παρουσιάζεται η ανάλυση των προϊόντων εγκλεισμού των *d*- και *l*- εναντιομερών βορνεόλης σε α - και β - κυκλοδεξτρίνη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι, κυρίως, από έξη, επτά και οκτώ μονάδες α -(1-4)-D γλυκοπυρανόζης (α -CD, β -CD και γ -CD, αντίστοιχα). Στην υδρόφοβη κοιλότητα που διαθέτουν μπορεί να εγκλειστεί το υδρόφοβο τμήμα ενός μεγάλου αριθμού μορίων (ξενιζόμενα μόρια), που διαθέτουν το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό μαζί με τις κυκλοδεξτρίνες (μόρια ξενιστές), προϊόντα εγκλεισμού. Τα ξενιζόμενα μόρια συγκρατούνται μέσα στην κοιλότητα των CDs με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς H, van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο εγκλεισμός τροποποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ξενιζόμενου μορίου αφού αφενός βελτιώνει χαρακτηριστικά του όπως η υδατοδιαλυτότητα και συγχρόνως το προστατεύει από χημική αποδόμηση, οξειδωση, κ.α.

Η βορνεόλη είναι ένα δικυκλικό μονοτερπένιο, που απαντάται στα αιθέρια έλαια μιας πληθώρας φαρμακευτικών φυτών και χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική. Είναι μια πτητική χειρόμορφη αλκοόλη, που απαντάται σε δυο εναντιομερείς μορφές *d*- και *l*-. Τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμού ρακεμικού μίγματος των δυο εναντιομερών.

Οι κρυσταλλικές δομές των προϊόντων εγκλεισμού των *d*- και *l*- εναντιομερών βορνεόλης σε α - και β -CD επιλύθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ σε διακριτότητα περίπου 1 Å. Η γεωμετρία εγκλεισμού είναι παρόμοια μεταξύ των συμπλόκων των εναντιομερών στον ίδιο ξενιστή. Συγκεκριμένα, τόσο στα σύμπλοκα της α -CD όσο και σε εκείνα της β -CD, οι ξενιστές σχηματίζουν διμερή τύπου κεφαλής-κεφαλής που

διευθετούνται κρυσταλλικά με τύπο «σκακιέρας». Στην μοναδιαία κυψελίδα των συμπλόκων d -, l - α -CD, ένα μόριο d - ή l -βορνεόλης εγκλείεται στο μεσοδιάστημα της κοιλότητας του διμερούς των α -CD (στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζόμενου 2:1) αποδιατεταγμένο σε δυο ή τρεις θέσεις. Στην περίπτωση των d - και l - β -CD ένα ξενιζόμενο μόριο, έντονα αποδιατεταγμένο, βρίσκεται εγκλεισμένο στο μεσοδιάστημα της κοιλότητας του σχηματισμένου διμερούς («εσωτερικό»), ενώ δυο ακόμα ξενιζόμενα μόρια βρίσκονται στις πλευρές των πρωτοταγών υδροξυλομάδων του διμερούς («εξωτερικά») και σταθεροποιούνται με υδρογονικούς δεσμούς με μόρια νερού και με τα υδροξύλια ξενιστή γειτονικών διμερών (στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζόμενου 2:3).

Από την σύγκριση των κρυσταλλογραφικών δομών αυτών των συμπλόκων προκύπτει ότι: i) το μόριο της d - ή l - βορνεόλης είναι λιγότερο αποδιατεταγμένο όταν εγκλείεται στην μικρότερη κοιλότητα των α -CD διμερών σε σχέση με αυτή των β -CD και ii) Η «εσωτερικά» εγκλεισμένη d - βορνεόλη σε α - ή β -CD διμερές εμφανίζει μικρότερη αποδιάταξη συγκριτικά με την αντίστοιχα εγκλεισμένη l -βορνεόλη.

Abstract

In this thesis the X-ray crystallographic analysis of large and medium-small size biomolecules and their complexes is presented.

The first part consists of the crystal structure of the cytoplasmic cyclophilin-A from *Azotobacter vinelandii* (*AvCyPA* or *AvPPIB*). Cyclophilins belong to a class of peptidyl-prolyl isomerase enzymes (PPIases) which catalyze the *cis-trans* isomerization of peptide bonds preceding proline residues of protein substrates. In addition to the isomerization, which accelerates protein folding, cyclophilins are involved in intracellular protein transport, signal transduction, trafficking, and cell cycle regulation. Cyclophilins are of significant biomedical interest because binding of cyclophilin to cyclosporin A (CsA) mediates immunosuppressive effects that are medically utilized in the prevention of transplant rejection. Another important activity is the binding of cyclophilin to the HIV-1 CA protein that facilitates viral replication. Determination of cyclophilin structures from a broad range of organisms have shown that the protein adopts an eight-stranded antiparallel β -barrel structure containing a peptide binding site surrounded by mobile loops. Structures of cyclophilins bound to propyl-peptides in the *cis*- or *trans*-form provided snapshots of the enzymatic mechanism.

The crystal structure of the cytoplasmic cyclophilin A from *Azotobacter vinelandii* (*AvCyPA* or *AvPPIB*) was determined at 2.2 Å resolution. In addition, the crystal structure of the enzyme complexed with the synthetic tetrapeptide succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-p-nitroanilide (suc-AFPF-pNA) was determined at 2.0 Å resolution and shows that the tetrapeptide proline adopts a *cis*-isomer conformation. Comparisons between the uncomplexed and complexed structures as well as with other CyPA structures provides additional insights about conformational variability, effects of peptide binding and structure-function relationships of this enzyme.

Finally, we designed point mutants by changing aminoacids that are located outside from the active site of the enzyme in order to examine the influence of such a substitution on the overall dynamic structural network involved in catalysis. The *AvPPIB*_{A84S}, *AvPPIB*_{A84T} and *AvPPIB*_{M49A} mutants showed little or no difference in PPIase activity in comparison with the native enzyme.

The second part of this thesis deals with the crystal structures of the inclusion compounds of (*d*)- and (*l*)-borneol stereomers in α - and β -cyclodextrin by X-ray crystallography at 1 Å resolution. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides consisting of six, seven or eight α -(1-4)-linked D-glucopyranose residues, called respectively α -, β - or γ - CD. As they possess a hydrophobic cavity, the hydrophobic moieties of a wide variety of guest molecules, having suitable size and shape, may be included there and form inclusion compounds. The guest molecules are held inside the CD cavity by non-covalent interactions, such as hydrogen bonds, van der Waals or hydrophobic interactions. The encapsulation modifies the physico-chemical properties of the guests by increasing their solubility in water and resulting in an augmented protection against chemical degradation, oxidation, etc.

Borneol is a bicyclic monoterpene present in the essential oils of numerous medicinal plants used in pharmaceutical industry. It is a volatile chiral alcohol occurring in two enantiomeric forms the *d* and *l*. Modified cyclodextrins have been used for chiral recognition of the two enantiomeric forms.

The crystal structures of the inclusion compounds of (*d*)- and (*l*)-borneol stereomers in α - and β -CD were determined by X-ray crystallography at about 1 Å resolution. The complexes of the borneol enantiomers with the same host molecule have the same inclusion geometry. The α - or β -CDs form head-to-head dimers arranged in a “chessboard” crystal packing mode. In the cases of the *d*- and *l*-/ α -CD complexes, one guest molecule is accommodated within the formed interdimeric cavity (2:1 host:guest stoichiometry) disordered over two or three sites. On the other hand, in the cases of the *d*- and *l*-/ β -CD complexes, a highly disordered guest molecule is found located within the formed interdimeric cavity and two more guest molecules are found at the rims of the primary hydroxyls of the dimer (2:3 host:guest stoichiometry), participating in the crystal contacts by forming H-bonds with external water molecules and -OH groups of the β -CDs of the adjacent dimers.

The results of this crystallographic analysis have shown that (i) the *d*- or *l*-borneol molecule is found significantly less disordered within the α -CDs dimer cavity than the larger β -CDs dimer cavity indicating that the complexation of the borneol with α -CD is more stable compared to that with β -CD and (ii) the only differentiation

observed between the structures of the complexes of the enantiomers with the same host CD is that the encapsulated *d*-borneol molecule in the α - or β -CD dimer is found significantly less disordered than the *l*-borneol in the corresponding complexes.

Επιστημονική περιοχή/Scientific area:

Δομική Βιολογία	Structural Biology
Ενζυμικοί Μηχανισμοί	Enzyme Mechanisms
Υπερμοριακή Χημεία	Supramolecular Chemistry
Φαινόμενα Εγκλεισμού και Μακροκυκλική Χημεία	Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry
Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	X-ray Crystallography

Λέξεις-Κλειδιά/Keywords:

Κυκλοφιλίνη	Cyclophilin
<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Ισομεράσες προλίνης	Peptidyl-prolyl Isomerases
Βορνεόλη	Borneol
Κυκλοδεξτρίνες	Cyclodextrins
Προϊόντα Εγκλεισμού	Inclusion Complexes
Κρυσταλλική δομή	Crystal Structure

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη διδακτορική διατριβή περιλαμβάνονται στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια:

Δημοσιεύσεις :

- **E. Christoforides**, M. Dimou, P. Katinakis, K. Bethanis and M. Karpusas Structure of a bacterial cytoplasmic cyclophilin A in complex with a tetrapeptide *Acta Cryst.* (2012). F68, 259-264
- K. Bethanis, P. Tzamalis, F. Tsorteki, A. Kokkinou, **E. Christoforides**, D. Mentzafos Structural study of the inclusion compounds of thymol, carvacrol and eugenol in b-cyclodextrin by X-ray crystallography *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* (2012) DOI 10.1007/s10847-012-0230-9
- **E. Christoforides**, F. Tsorteki, A. Kokkinou, D. Mentzafos & K. Bethanis Essential oils encapsulated in Cyclodextrins. Part IV. Study of the inclusion compounds of (+)- and (-)- borneol enantiomers in native Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* (2013), *In press*

Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια :

- **E. Christoforides**, F. Tsorteki, A. Kokkinou, P. Tzamalis, A. Hountas, K. Bethanis, C. Pappas and D. Mentzafos Crystal structure of cyclodextrin complexes with antioxidant substances *Acta Cryst.* (2009). A65, s258, 25th European Crystallography Meeting, Istanbul, Turkey
- **E. Christoforides**, M. Dimou, P. Katinakis, K. Bethanis and M. Karpusas Crystal structure of Cyclophilin-A enzyme from *Azotobacter vinelandii* *Acta Cryst.* (2011). A67, C790, 22nd IUCR Congress and General Assembly, Madrid, Spain

Η έγκριση της παρούσης διδακτορικής διατριβής υπό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέως [Νόμος 5343/1932, άρθρο 202].

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσικής του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.), υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή κ. Κώστα Μπεθάνη, κατά το χρονικό διάστημα 2009-2013. Η έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός των ενζύμων, οι σημειακές μεταλλάξεις καθώς και η μελέτη ενεργότητας των ενζύμων έγιναν στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. Η συλλογή πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ τόσο από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, όσο και από κρυστάλλους συμπλόκων κυκλοδεξτρινών πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» ή στον Σταθμό των Ευρωπαϊκών Εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας (EMBL), στο Αμβούργο της Γερμανίας.

Λόγω της διαφορετικής φύσης των υπό μελέτη ουσιών, δηλαδή του ενζύμου της Κυκλοφιλίνης-Α από το βακτηρίδιο *Azotobacter vinelandii* και των υπερμοριακών συμπλόκων των εναντιομερών μορφών της βορνεόλης με φυσικές κυκλοδεξτρίνες (αν και η κρυσταλλογραφία ήταν η κοινή μέθοδος δομικής μελέτης), η εργασία κρίθηκε σκόπιμο να χωριστεί σε δυο μέρη. Στόχος του πρώτου μέρους είναι η επίλυση της κρυσταλλικής δομής της κυκλοφιλίνης και η εξαγωγή συμπερασμάτων χρήσιμων για τη λειτουργία της. Το δεύτερο μέρος αφορά στη κρυσταλλογραφική ανάλυση των προϊόντων εγκλεισμού εναντιομερών μορφών της βορνεόλης σε φυσικές κυκλοδεξτρίνες, για την μελέτη της δομής αυτών των συμπλόκων αλλά και την κατανόηση της πιθανής δομικής διαφοροποίησης συμπλόκων εναντιομερών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Κώστα Μπεθάνη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση του θέματος, καθώς και για το έντονο ενδιαφέρον του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής. Παράλληλα, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθ. Παναγιώτη Κατινάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τα ένζυμα των κυκλοφιλινών και Αν. Καθ. Μιχάλη Καρπούζα για την εισαγωγή στον κόσμο της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας.

Τον Ομ. Καθ. Δημήτρη Μεντζαφό για την συνεχή παρότρυνσή του για την ενασχόλησή μου με την κρυσταλλογραφία των κυκλοδεξτρινών, η συμβολή του οποίου στο συγκεκριμένο αντικείμενο υπήρξε πάντα πηγή έμπνευσης και δημιουργικότητας για όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσικής του Γ.Π.Α.

Την Λέκτορα Μαρία Δήμου και την Δρ. Φραντζέσκα Τσορτέκη για την καθοδήγηση και αλόγυστη βοήθειά τους σε κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας.

Τον Καθ. Αθανάσιο Χούντα και τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσικής (Δρ. Αρετή Κοκκίνου και Δρ. Παύλο Τζαμαλή), που με τις γνώσεις και την φιλικότητά τους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μέσα σε ένα ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα.

Την Δρ. Ειρήνη Μαυρίδου και τον Δρ. Εμμανουήλ Σαρειδάκη του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και το προσωπικό του σταθμού εργασίας X-13 του EMBL στο Αμβούργο για την βοήθειά τους στην συλλογή δεδομένων.

Τους φίλους και συμφοιτητές μου Λυκούργο Χηριάδη, Βάσω Τριανταφυλλοπούλου και Κατερίνα Φουρτάκα τόσο για την άψογη συνεργασία κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, όσο και για την γενικότερη συμπαράσταση και καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, στους γονείς και την αδελφή μου, οι οποίοι με στήριξαν ηθικά και ουσιαστικά σε κάθε προσπάθεια και επιλογή μου.

Σκοπός

Το βακτηρίδιο *Azotobacter vinelandii*, ένας ευρέως γνωστός αερόβιος οργανισμός του εδάφους, με σημαντικό γεωργικό ενδιαφέρον έχει δυο γονίδια κωδικοποιούν για το ένζυμο της κυκλοφιλίνης: η κυτταροπλασματικής μορφή *AvPPIB* (γνωστή και ως *AvCyPA*) και η περιπλασματική μορφή *AvPPIA* (γνωστή και ως *AvCyPB*). Πρόσφατες μελέτες του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. έδειξαν πως η κυτταροπλασματική κυκλοφιλίνη εμφανίζει δράση ισομεράσης σε πειράματα με την χρήση τετραπεπτιδίων (*suc-AXaaPF-pNA*, όπου X: A, F ή L).

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η επίλυση των κρυσταλλικών δομών της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης-A από το *A. vinelandii*, τόσο στην ελεύθερη μορφή της όσο και σε σύμπλοκό της με συνθετικά τετραπεπτίδια (*suc-AXaaPF-pNA*). Αυτές οι δομικές μελέτες για την κυκλοφιλίνη-A από έναν νέο οργανισμό ενισχύουν τις υπάρχουσες δομικές μελέτες και βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της σχέσης μεταξύ διαφοροποίησης της ακολουθίας και μοριακής λειτουργίας. Επιπροσθέτως, ο καθορισμός της δομής του ενζύμου επιτρέπει την αναγνώριση κατάλοιπων, σημαντικών για την κατάλυση στον δεδομένο οργανισμό. Επομένως, καθίσταται δυνατή η μελέτη της επίδρασης σημειακών μεταλλάξεων, που σχεδιάστηκαν με βάση την δομή, στην ενεργότητα ισομεράσης του ενζύμου.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής εξετάζονται κρυσταλλογραφικά τα σύμπλοκα των εναντιομερών μορφών της βορνεόλης σε φυσικές κυκλοδεξτρίνες. Οι ευεργετικές ιδιότητες της βορνεόλης την καθιστούν ευρέως χρήσιμη στα πεδία της φαρμακευτικής και των τροφίμων, οι εφαρμογές της, όμως, σε αυτά τα πεδία περιορίζονται εξαιτίας των προβλημάτων στα στάδια παρασκευής και αποθήκευσης των προϊόντων της, που προκύπτουν λόγω της υψηλής εξάχνωσης και της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της. Σκοπός της παρούσας κρυσταλλογραφικής μελέτης είναι να συμβάλει στη δομική ανάλυση και κατανόηση των προϊόντων εγκλεισμού της βορνεόλης σε κυκλοδεξτρίνες (CDs), που σχηματίζονται με σκοπό τη βελτίωση της σταθερότητας και της υδατοδιαλυτότητας της. Ως μόρια ξενιστές επιλέγονται οι α - και β -CDs για τους ακόλουθους λόγους: (i) Είναι φυσικές κυκλοδεξτρίνες και καταγράφονται ως ασφαλή πρόσθετα φαρμάκων και τροφίμων, (ii) είναι οικονομικές, ιδιαίτερα η β -CD της οποίας το κόστος επιτρέπει τη χρήση της σε βιομηχανική κλίμακα και (iii) έχουν κατάλληλο

μέγεθος υδρόφοβης κοιλότητας για το σταθερό εγκλεισμό του μορίου της βορνεόλης. Από την άλλη πλευρά, σε αρκετές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στον εγκλεισμό εναντιομερών μορίων σε κυκλοδεξτρίνες και γι' αυτό το λόγο κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στη σταθερή φάση της υγρής χρωματογραφίας και της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Η δομική μελέτη των προϊόντων εγκλεισμού των εναντιομερών της βορνεόλης σε α - και β -CD, σκοπεύει να συμβάλει στην κατανόηση της ικανότητας μοριακής/χειρόμορφης αναγνώρισης από φυσικές κυκλοδεξτρίνες. Το προϊόν εγκλεισμού της βορνεόλης σε β -CD και τροποποιημένες β -CD έχει μελετηθεί φασματοσκοπικά και θερμοδομετρικά όσον αφορά την μοριακή και χειρόμορφη αναγνώριση. Ωστόσο, η κρυσταλλική δομή κανενός από τα δυο εναντιομερή σε σύμπλοκα με φυσικές CDs δεν έχει μελετηθεί έως τώρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Συνομογραφίες	xviii
Κεφάλαιο 1 ^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. Η υπεροικογένεια των ισομερασών προλίνης	2
1.1.1. Η οικογένεια των κυκλοφιλινών.....	4
1.1.1.α. Λειτουργίες και χρήσεις των κυκλοφιλινών σε φαρμακευτικές αγωγές.....	5
1.1.1.β. Δομικές-βιοχημικές μελέτες κυκλοφιλινών από διαφορετικούς οργανισμούς.....	8
1.1.2. Οι οικογένειες των FKBP's και Παρβουλινών.....	14
1.1.3. Η δράση <i>cis/trans</i> ισομεράσης προλίνης.....	15
1.1.4. Καταλυτικός Μηχανισμός Ισομερασών.....	17
1.1.5. Το βακτήριο <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
1.2. Κυκλοδεξτρίνες-Προϊόντα εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες	21
1.2.1. Εγκλεισμός και δημιουργία προϊόντων εγκλεισμού.....	24
1.2.2. Εφαρμογές του εγκλεισμού.....	25
1.2.2.α. Εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών.....	25
1.2.2.β. Εφαρμογές σε άλλες βιομηχανίες.....	26
1.2.2.γ. Χρήση για διαχωρισμό ρακεμικού μίγματος.....	27
1.2.3. Βορνεόλη.....	28
1.2.3.α. Φυσικοχημικές ιδιότητες της βορνεόλης.....	29
1.2.3.β. Χρήσεις βορνεόλης.....	30
1.2.3.γ. Σχηματισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος εγκλεισμού βορνεόλης σε β-CD.....	32
Κεφάλαιο 2 ^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-X.....	34
2.1. Κρυσταλλογραφία	34
2.1.1. Κρυστάλλωση.....	34
2.1.1.α. Πρωτεϊνική κρυστάλλωση.....	35
2.1.1.β. Κρυστάλλωση με την Μέθοδο Αργής Ψύξης.....	39
2.1.2. Συλλογή δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X.....	40
2.1.2.α. Ακτίνες-X – Οργανολογία.....	40
2.1.2.β. Γεωμετρία της περίθλασης-Νόμος Bragg.....	42
2.1.3. Επεξεργασία δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X.....	46
2.1.4. Καθορισμός κρυσταλλικής δομής.....	48
2.1.4.α. Ένταση και παράγοντας δομής.....	48
2.1.4.β. Συνάρτηση Patterson.....	49
2.1.4.γ. Η επίλυση της δομής.....	50
2.1.4.δ. Ανοικοδόμηση μοντέλου.....	57
2.1.4.ε. Βελτιστοποίηση δομής.....	58
2.1.4.στ. Αξιολόγηση και κατάθεση δομής.....	61
Κεφάλαιο 3 ^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ-Α ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΗΣ.....	64
3.1. Έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου της Κυκλοφιλίνης Α και μεταλλαγμάτων της	64
3.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων.....	64
3.1.2. Υποκλωνοποίηση τμήματος νουκλεϊνικών οξέων σε πλασμιδιακό φορέα.....	65
3.1.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	66

3.1.4. Κατευθυνόμενη σημειακή μετάλλαξη της <i>AnCyPA</i>	68
3.1.5. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Eschericia coli</i>	70
3.1.6. Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας.....	71
3.2. Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων στην ενεργότητα του ενζύμου	76
3.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη της Κυκλοφιλίνης-A	79
3.3.1. Κρυστάλλωση της κυκλοφιλίνης-A.....	79
3.3.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων μονοκρυστάλλου της ελεύθερης μορφής της Κυκλοφιλίνης A.....	85
3.3.3. Καθορισμός της δομής της ελεύθερης μορφής της Κυκλοφιλίνης A.....	87
3.4. Κρυσταλλογραφική μελέτη της κυκλοφιλίνης A σε σύμπλοκο με το συνθετικό τετραπεπτίδιο suc-AFPF-pNA	90
3.4.1. Κρυστάλλωση του συμπλόκου <i>AnCyPA/suc-AFPF-pNA</i>	90
3.4.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων μονοκρυστάλλου του συμπλόκου <i>AnCyPA/suc-AFPF-pNA</i>	92
3.4.3. Καθορισμός της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου <i>AnCyPA/AFPF</i>	93
3.5. Αποτελέσματα	97
3.5.1. Ποιότητα δεδομένων και αξιοπιστία τελικών μοντέλων	97
3.5.2 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης <i>AnCyPA</i> και του δεσμευμένου πεπτιδίου ...	100
3.6. Συζήτηση	106
3.6.1. Σύγκριση των δομών της ελεύθερης και της δεσμευμένης στο πεπτίδιο <i>AnCyPA</i>	106
3.6.2. Σύγκριση με δομές της κυκλοφιλίνης-A από άλλους οργανισμούς.....	108
3.6.3. Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου	112
3.6.4. Συμπεράσματα – Προοπτικές	113
Κεφάλαιο 4^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ	116
4.1. Εγκλεισμός και κρυστάλλωση με την μέθοδο αργής ψύξης	116
4.1.1. Τα σύμπλοκα (<i>d,l</i>)-βορνεόλης/ α -CD	116
4.1.2. Τα σύμπλοκα (<i>d,l</i>)-βορνεόλης/ β -CD	118
4.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	119
4.2.1. Τα σύμπλοκα (<i>d,l</i>)-βορνεόλης/ α -CD	119
4.2.2. Τα σύμπλοκα (<i>d,l</i>)-βορνεόλης/ β -CD	122
4.3. Επίλυση και βελτιστοποίηση δομών	123
4.4. Αποτελέσματα	125
4.4.1. Δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων (<i>d,l</i>)-Βορνεόλης/ α -CD.....	125
4.4.1.α. Περιγραφή των δομών.....	125
4.4.1.β. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών	128
4.4.1.γ. Η κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση	128
4.4.2. Δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων (<i>d,l</i>)-Βορνεόλης/ β -CD.....	130
4.4.2.α. Περιγραφή των δομών.....	130
4.4.2.β. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών	134
4.4.2.γ. Η κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση	134
4.5. Συζήτηση	140
4.5.1. Συμπεράσματα	140
Βιβλιογραφία	146

Συντομογραφίες

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος	Σύντμηση
Κυκλοφιλίνη Α	Cyclophilin A	CyPA
Ισομεράση Προλίνης Β	Peptidyl Prolyl Isomerase B	PIIB
Ηλεκτρώλο-Αλανίνη-Φαινυλαλανίνη-Προλίνη-Φαινυλαλανίνη-p-νιτροανιλίδιο	Succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-p-nitroanilide	suc-AFPF-pNA
Τριφθοροαιθανόλη	Trifluoroethanol	TFE
Κυκλοσπορίνη	Cyclosporin	CsA
Άμινο τελικό άκρο	Amino terminus	N-τελικό άκρο
Καρβόξυ τελικό άκρο	Carboxyl terminus	C-τελικό άκρο
Ενδοπλασματικό δίκτυο	Endoplasmic Reticulum	ΕΔ
Μοριακή Αντικατάσταση	Molecular Replacement	MR
Δωδεκανοθειϊκό νάτριο	Sodium Dodecyl Sulphate	SDS
Επίτοπος ιστιδινών	Histide tag region	6xHIS
Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων	Protein Data Bank	PDB
Καταλυτική σταθερά	Catalytic constant	K_{cat}
Σταθερά Michaelis	Michaelis constant	K_m
Προσδεμένη στην FK-506 πρωτεΐνη	FK-506 Binding Protein	FKBP
Νίτριλοτριοξικό οξύ	Nitrilotriacetic acid	NTA
Πολυαιθυλενογλυκόλη	PolyEthyleneGlycol	PEG
2-μεθυλ-2,4-πεντανδιόλη	2-Methyl-2,4-pentanediol	MPD
N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N'-αιθανοσουλφονικό οξύ	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-3-ethanesulfonic acid	HEPES
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ	Ethylenediaminetetraacetic Acid	EDTA
Διθειοθρεϊτόλη	DL-Dithiothreitol	DTT
Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη	Tetramethylethylenediamine	TEMED
Υπεροξυθειϊκό αμμώνιο	Ammonium persulfate	APS
Δις-ακρυλαμίδιο	Bis-acrylamide	Bis
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Polymerase Chain Reaction	PCR
Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	PAGE
Μη Κρυσταλλογραφική Συμμετρία	Non Crystallographic Symmetry	NCS

Ελάχιστα Τετράγωνα	Least Squares	L.S.
Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός	Nuclear Magnetic Resonance	NMR
Φασματοσκοπία Υπεριώδους-ορατού	Ultra Violent-Visible spectroscopy	UV-Vis
2,6 Διμέθυλο-β- κυκλοδεξτρίνη	2,6-Di-O-methyl-β- cyclodextrin	DIMEB
α-κυκλοδεξτρίνη	α-cyclodextrin	α-CD
β-κυκλοδεξτρίνη	β-cyclodextrin	β-CD

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

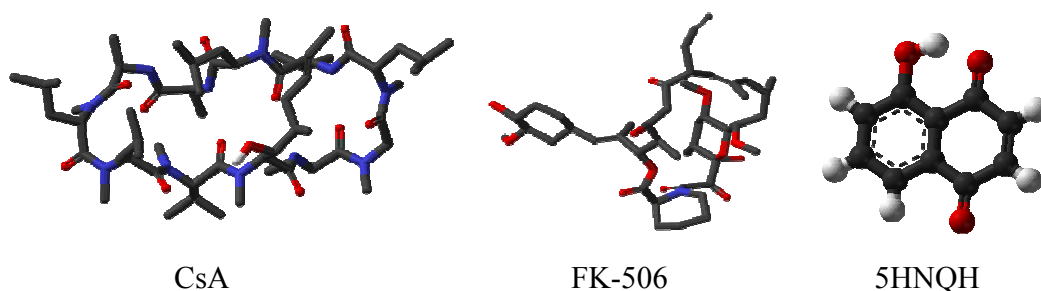
Κεφάλαιο 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η υπερουκογένεια των ισομερασών προλίνης

Το δίπλωμα των πρωτεϊνών θεωρείται μια αυθόρμητη διεργασία μετατροπής της γραμμικής πρωτοταγούς ακολουθίας των αμινοξέων της νεοσχηματιζόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε μια καλά οργανωμένη τρισδιάστατη δομή. Πειράματα επαναδιπλώματος αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών έδειξαν πως τα βήματα που απαιτούνται για το δίπλωμα σφαιρικών, απλών πολυπεπτιδίων συμβαίνουν σε δευτερόλεπτα ή χιλιοστά του δευτερολέπτου στην χρονική κλίμακα. Ωστόσο, μια σχετική αλλαγή στη διαμόρφωση που λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια του διπλώματος διαρκεί αρκετά παραπάνω. Πρόκειται για την *cis-trans* ισομερίωση πεπτιδικών δεσμών που περιέχουν προλίνη. Οι περισσότεροι πεπτιδικοί δεσμοί εμφανίζονται στην *trans* μορφή τους κατά την βιοσύνθεσή τους στα ριβοσώματα, καθώς και στην αρχική τους (*native*) κατάσταση. Αυτό συμβαίνει διότι οι χαμηλής ενεργειακής στάθμης *trans* πεπτιδικοί δεσμοί, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες σχηματίζουν γωνία 180° μεταξύ τους, ευνοούνται στερεοχημικά. Ωστόσο, στην περίπτωση που συμμετέχει στο δεσμό η προλίνη, τόσο η *cis* όσο και η *trans* διαμόρφωση του δεσμού είναι πιθανές (Gothel & Marahiel, 1999). Η προλίνη που εμφανίζεται στην *cis* μορφή έχει τις γειτονικές πλευρικές αλυσίδες κοντά μεταξύ τους. Όμως, τόσο το *de novo* δίπλωμα και η διαδικασία αναδίπλωσης απαιτούν ισομερίωση προλίνης στην *cis* μορφή της. Τυχαία ισομερίωση των δεσμών πεπτιδίου-προλίνης απαιτεί ελεύθερη ενέργεια και είναι μια αργή διαδικασία, ειδικά, σε χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Οι ισομεράσες προλίνης σταθεροποιούν την μεταβατική κατάσταση της *cis-trans* ισομερίωσης, διαδικασία σημαντική όχι μόνο για το πρωτεϊνικό δίπλωμα αλλά και για την συναρμολόγηση πρωτεϊνών με πολλαπλές περιοχές (Wang & Heitman, 2005).

Οι Gothel και Marahiel (1999) σε ένα άρθρο ανασκόπησης επιχειρούν μια ιστορική αναδρομή στις ισομεράσες προλίνης (κυκλοφιλίνες, FKBP's και παρβουλίνες). Πιο ειδικά αναφέρουν πως η πρώτη ισομεράση προλίνης (PPIase EC 5.1.2.8) απομονώθηκε το 1984 από φλοιό νεφρού χοίρου από τον Fischer. Εκείνη την εποχή γινόταν εκτεταμένη έρευνα για τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα του ανοσοκατασταλτικού

φαρμάκου κυκλοσπορίνη-A(CsA). Η CsA είναι ένα ενδεκαπεπτιδίο που παράγεται από μια πληθώρα ατελών μυκήτων όπως ο *Tolyrocladium inflatum*, και που χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο. Ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως προληπτικά και σε θεραπείες για την αποφυγή απόρριψης ανθρωπίνων μοσχευμάτων έπειτα από επέμβαση μεταμόσχευσης οργάνων ή ιστών. Το 1989, έγινε γνωστό πως κυκλοφιλίνες και *cis-trans* ισομεράσες προλίνης είναι διαφορετικά είδη της ίδιας πρωτεΐνης. Εκείνη την εποχή, ωστόσο, μια άλλη ισομεράση ανακαλύφθηκε κατά την διάρκεια πειραμάτων για τον υποδοχέα του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου FK506. Το FK506 είναι ένα πολυκετιδίο που παράγεται από τον *Streptomyces tsukubaesis*, ένα είδος που παρατηρήθηκε σε δείγμα χώματος από τον Tsukuba στην Ιαπωνία. Συνδέεται δομικά με την ραπαμυκίνη (rapamycin), η οποία περιγράφηκε το 1975 ως μηκυτοκτόνος παράγων. Απομονώθηκε από τον *S. hygrosopicus* στα νησιά του Πάσχα και το όνομά του προέρχεται από την λέξη Rapa Nui, που είναι η τοπική ονομασία της νήσου του Πάσχα. Χρησιμοποιώντας την FK-506 ως μήτρα συγγένειας, ο πρωτεϊνικός υποδοχέας απομονώθηκε και ονομάστηκε προσδεμένη στην FK-506 πρωτεΐνη (FKBP). Ωστόσο, η αμινοξική ακολουθία των FKBP's βρέθηκε να είναι διαφορετική από εκείνη των κυκλοφιλινών, ακόμη και στην καταλυτική περιοχή. Οπότε, οι ισομεράσες αποτελούνται από διαφορετικές κλάσεις. Με κριτήριο την ικανότητα πρόσδεσης σε μόρια-προσδέτες, οι ισομεράσες πλέον διαιρούνται σε τρεις οικογένειες: Στις κυκλοφιλίνες που προσδέονται επιλεκτικά σε μόρια CsA, τις FKBP's σε FK-506 και τις παρβουλίνες σε γιουγλόνη (5-υδρόξυ-1,4-ναφθοκινόνη) (Σχήμα 1.1.).



Σχήμα 1.1. Η κυκλοσπορίνη (CsA), η FK-506 και η γιουγλόνη (5HNQH) είναι γνωστοί προσδέτες των κυκλοφιλινών, FKBP's και παρβουλινών, αντίστοιχα.

1.1.1. Η οικογένεια των κυκλοφιλινών

Οι κυκλοφιλίνες εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντηρητικότητας κατά την εξέλιξη και απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και ευκαρωτικούς οργανισμούς σε μεγάλες ποσότητες και σε πολλούς ιστούς. Τουλάχιστον οκτώ διαφορετικοί ισότυποι του ενζύμου έχουν βρεθεί στον άνθρωπο, με μοριακά βάρη από 18kDa έως 150kDa. Ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, οι δομικές ομοιότητες των κυκλοφιλινών κατά την εξέλιξη και η διατήρηση της δράσης ισομερίωσης όλων των μελών τους υπογραμμίζουν την σπουδαιότητα της ενζυμικής αντίδρασης

Όλες οι κυκλοφιλίνες περιέχουν μια κοινή περιοχή 109 αμινοξέων (cyclophilin-like domain), που περιβάλλεται από περιοχές μοναδικές για κάθε μέλος της οικογένειας, ανάλογα με την υποκυτταρική περιοχή που εντοπίζονται και την εξειδικευμένη δράση τους. Εκτός από τις 8 βασικές κυκλοφιλίνες στον άνθρωπο, η *Drosophila* έχει τουλάχιστον 9, το *Arabidopsis thaliana* 29 και 8 κυκλοφιλίνες έχουν βρεθεί στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Πιο αναλυτικά, η κυκλοφιλίνη-A (CyPA) είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 17.7kDa προσδένεται στην CsA σε νανομοριακές συγκεντρώσεις ($IC_{50}=6nM$). Το γεγονός πως η CyPA δεν εκφράζεται στα T-λεμφοκύτταρα θεωρήθηκε παράγοντας που προκαλεί αντιδράσεις σε κλινικές θεραπείες με CsA. Τα T-κύτταρα περιέχουν περίπου 3-7μg κυκλοφιλίνης ανά mg συνολικής πρωτεΐνης. Μεγάλη ποσότητα κυκλοφιλίνης έχει βρεθεί σε σπληνικά ερυθροκύτταρα και μυελοβλαστικά κύτταρα. Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη στους νευρώνες από τα νευρογλοιακά κύτταρα. Αρκετές ισομορφές του ενζύμου από θηλαστικά έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά. Όλες μοιράζονται μια κοινή ομολογία με την CyPA πάνω από 50%. Οι ισομορφές διαφέρουν ως προς το υποκυτταρικό διαμέρισμα που εντοπίζονται και ως προς την ικανότητα σύνδεσης με την CsA. Πολλές από αυτές περιέχουν μια N-τελική ακολουθία οδηγό που επιτρέπει στην κυκλοφιλίνη να μεταφερθεί σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα.

Η CyPB (21-kDa) περιέχει μια N-τελική ακολουθία οδηγό που μεσολαβεί για την μεταφορά της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Εντοπίζεται στην ίδια θέση με την καλρετικουλίνη (πρωτεΐνη που αποθηκεύει ασβέστιο), οδηγώντας στην υπόθεση πως η

CypB μπορεί να παίζει ρόλο στα εξαρτώμενα από Ca^{+2} μονοπάτια κατά την μετάδοση σήματος.

Η CyPC, που επίσης εντοπίζεται στο ΕΔ, έχει μέγεθος 23 kDa, περιέχει μια αλληλουχία σήματος στο N-τελικό άκρο και απομονώθηκε από μυϊκά T-κύτταρα. Η CyPC εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα νεφρά σε σύγκριση με το ήπαρ και τα T-κύτταρα. Η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης δεν πλήρως είναι γνωστή, αλλά έχει βρεθεί πως προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες-υποδοχείς.

Η CypD (18kDa) περιέχει μια αλληλουχία σήματος για μεταφορά σε μιτοχόνδριο, και η κυκλοφιλίνη NK-TR (150 kDa) θεωρείται τμήμα του συμπλόκου που αναγνωρίζει όγκους στην επιφάνεια των φυσικών κυττάρων φονιάδων (Natural Killer Cells, NK). Η ανθρώπινη CypNK είναι η μεγαλύτερη κυκλοφιλίνη, με μια μεγάλη, υδρόφιλη και θετικά φορτισμένη περιοχή στο C-τελικό άκρο και εντοπίζεται στο κυτόπλασμα.

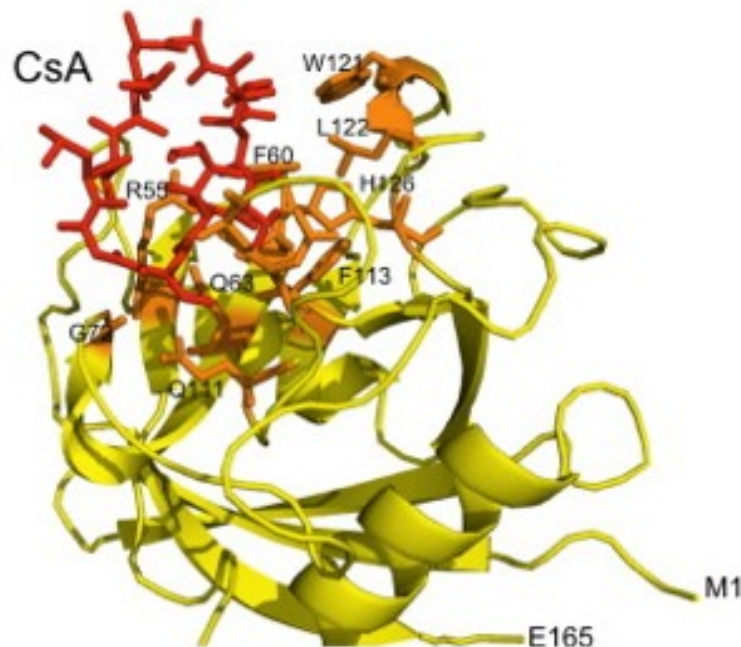
Η CypE έχει στο N-τελικό άκρο μια περιοχή πρόσδεσης RNA και εντοπίζεται στον πυρήνα.

1.1.1.α. Λειτουργίες και χρήσεις των κυκλοφιλινών σε φαρμακευτικές αγωγές

Οι κυκλοφιλίνες παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό συγγένειας με την CsA. Στα θηλαστικά, το σταθερό σύμπλοκο CsA-CyPA προσδένεται και παρεμποδίζει την καλσινευρίνη, μια σερίνο/θρεονινο εξειδικευμένη φωσφατάση που ενεργοποιείται από ασβέστιο και καλμοντουλίνη. Η παρεμπόδιση της καλσινευρίνης μπλοκάρει την μεταφορά του πυρηνικού παράγοντα ενεργοποίησης των T κυττάρων (NF-AT) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, εμποδίζοντας έτσι την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για κυτοκίνες (π.χ. ιντερλευκίνη-2). Στην ζύμη *S. cerevisiae*, η παρεμπόδιση του ομολόγου της καλσινευρίνης από το σύμπλοκο μεταξύ της CsA και του ομολόγου της CyPA Cpr1 εμποδίζει την ανάκαμψη από την επαγόμενη με φερομόνες αύξηση όγκων. Στον παθογόνο για τον άνθρωπο μύκητα *Cryptococcus neoformans*, η παρεμπόδιση του ομολόγου καλσινευρίνης Cna1 από το σύμπλοκο της CsA και με τις δυο ομόλογες πρωτεΐνες της κυκλοφιλίνης-A Cpa1 ή Cpa2 παρεμποδίζει την ανάπτυξή του σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η ανοσοκατασταλτική δράση της CsA εξαρτάται από το τριπλό σύμπλοκο μεταξύ των CsA, CyPA και καλσινευρίνης. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου έχει επιλυθεί

σε ανάλυση 2.8 Å (Σχήμα 1.2.). Η πρόσδεση του συμπλόκου CsA-CyPA στην καλσινευρίνη αυξάνει την σταθερότητα του συμπλόκου, και οι συμπλοκοποιημένες πρωτεΐνες παραμένουν ανθεκτικές στην πρωτεόλυση. Χάρη στην πρόσδεση της CsA στην CyPA, τα φορτία και οι υδρόφοβες επιφάνειες του συμπλόκου πρωτεΐνης φαρμάκου γίνονται πιο συμβατά με την θέση πρόσδεσης της καλσινευρίνης. Το σύμπλοκο CsA-CyPA δένεται στο μέσο των καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων της καλσινευρίνης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η πρόσδεση του CsA-CyPA συμπλόκου στην καλσινευρίνη εμποδίζει την δράση φωσφατάσης και τη βιολογική δράση της τελευταίας.



Σχήμα 1.2. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου *h*CyPA/CsA (PDB : 1CWA). Με κόκκινο χρώμα (sticks) απεικονίζεται το ενδεκαπεπτίδιο CsA, με πορτοκαλί (sticks) οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής πρόσδεσης του προσδέτη και με κίτρινο (cartoon) η κυκλοφιλίνη.

Μελέτες έχουν αποδώσει ένα καινούριο ρόλο στις κυκλοφιλίνες όσον αφορά την μετάδοση σήματος. Για παράδειγμα, η CyPA των θηλαστικών φαίνεται να ρυθμίζει την κίνηση Itk. Η τελευταία είναι μια πρωτεϊνική κίνηση της τυροσίνης (μη-υποδοχέας) που εμπλέκεται στην ωρίμανση των θυμοκυττών και που απαιτείται για ενδοκυτταρικά

σινιάλα οδηγώντας στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η πρόσδεση της CyPA στην SH2 περιοχή της Ikt επιφέρει δομικές αλλαγές στην SH2 περιοχή που μεταβάλλουν την ικανότητα εξειδικευμένης πρόσδεσης του μορίου. Μετάλλαξη ενός αμινοξέος προλίνης στην SH2 περιοχή διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ Ikt και CyPA και αυξάνει την παραγωγή κυτοκινινών τύπου 2 (Th2). Σε ένα άλλο παράδειγμα κυκλοφιλίνης που εμπλέκεται στην μετάδοση σήματος, η ανθρώπινη CyPB έχει βρεθεί πως ενεργοποιεί τον παράγοντα ρύθμισης ιντερφερόνης 3 (IRF-3). Ο IRF-3 είναι ένα μέλος της ομάδας των ρυθμιστών ιντερφερόνης που επάγουν την ιντερφερόνη-β μόλις εισαχθούν στον πυρήνα. Η CyPB αλληλεπιδρά με τον IRF-3 όπως δείχνουν βιοδοκιμές στην ζύμη. Όσον αφορά αλληλεπίδραση της CyPB με RNA η καταστολή της φωσφορυλίωσης του IRF-3 που ενεργοποιεί ιούς και άλλα παρόμοια γεγονότα έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμόδιση της ιντερφερόνης-β.

Η μιτοχονδριακή CyPD παίζει ρόλο στην διαπερατότητα του οργάνου, χάρη στην οποία οι μιτοχονδριακοί πόροι ανοίγουν, οδηγώντας το κύτταρο στον θάνατο. Μεταλλαγμένα ως προς την CyPD ποντίκια, έδειξαν πως η τελευταία και η μιτοχονδριακή διαπερατότητα απαιτούνται για να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από ασβέστιο οξειδωτική καταστροφή, όχι όμως και η αναπόφευκτη απόπτωση στην οποία εμπλέκονται πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Περαιτέρω μελέτη του ρόλου της CyPD στην μιτοχονδριακή λειτουργία και χρήση της ως πιθανό μόριο στόχος για την δημιουργία φαρμάκων εξετάζονται ενδελεχώς έως σήμερα.

Οι κυκλοφιλίνες επάγουν αντιδράσεις υπερευαισθησίας μέσω διέγερσης της ανοσοσφαιρίνης E (Immunoglobulin E, IgE). Οι ανθρώπινες CyPs αναγνωρίζονται από τις IgE του ορού σε ασθενείς ευαίσθητους στις περιβαλλοντικές κυκλοφιλίνες. Η αυτοαντίδραση μέσω της IgE σε αντιγόνα του σώματος που εμφανίζουν ομοιότητες με αλλεργιογόνα του περιβάλλοντος παρατηρείται συχνά σε άτομα με ατοπική διαταραχή. Επομένως, σύγκριση της κρυσταλλικής δομής ανθρώπινων πρωτεϊνών που παρουσιάζουν ομοιότητες με αλλεργιογόνα μπορεί να μας επιτρέψουν να αναγνωρίσουμε τις δομικές ομοιότητες που επεξηγούν επαρκώς την αυτοαντίδραση. Η κυκλοφιλίνη από την ζύμη *Malassezia sympodialis* (Mala s 6) λύθηκε με μοριακή αντικατάσταση με μοντέλο την ανθρώπινη κυκλοφιλίνη και έχουν εντοπιστεί περιοχές με αμινοξέα εκτεθειμένα προς τον

διαλύτη και στις δυο δομές που πιθανόν να εμπλέκονται στην αυτό αντίδραση μέσω IgE (Glaser et al., 2006).

Πολλές διαδικασίες διπλώματος πρωτεϊνών εξαρτώνται από την καταλυτική δράση ή/και την δράση συνοδού των κυκλοφιλινών. Για παράδειγμα, η CypA προάγει τόσο τον σχηματισμό και την μετάδοση των ισοωματιδίων του παθογόνου για τον άνθρωπο ιού HIV-1. Η CyPA εισάγεται στο περίβλημα του HIV-1, όπου αλληλεπιδρά με την HIV-1 Gag, το πολυπρωτεϊνικό πρόδρομο της δομής του περιβλήματος του ιού. Μια μικρή περιοχή της πρωτεΐνης του καψιδίου του ιού που περιέχει τέσσερις συντηρημένες προλίνες έχει αναδειχθεί ως σημαντική για την εγκατάσταση της CypA στον ιό. Μια εξειδικευμένη του αμφιβληστροειδούς κυκλοφιλίνη της μύγας της Μεσογείου, NinaA (ένα ορθόλογο της CypC), είναι καθοριστική για το δίπλωμα των ισόμορφων της ροδοψίνης. Μετάλλαξη στο γονίδιο της NinaA έχει ως αποτέλεσμα το μη κατάλληλο δίπλωμα της ροδοψίνης και την ακόλουθη μη κανονική έκφραση της πρωτεΐνης. Η CypA είναι επίσης σημαντική στο δίπλωμα νευρωνικών υποδοχέων.

Οι κυκλοφιλίνες δρουν και ως τροποποιητές πρωτεϊνικής λειτουργίας. Η κυκλοφιλίνη 40 των θηλαστικών αποτελεί κομμάτι συμπλόκου υποδοχέα στεροειδών και μπορεί να σχηματίζει διμερές σύμπλοκο με την θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη Hsp90, μια διεργασία που δεν επηρεάζεται από την CsA. Στην ζύμη, οι ομόλογες της CyP40 Cpr6 και Cpr7 επίσης συνδέονται με ομόλογες της Hsp90 και εμφανίζουν παρόμοια δράση. Μια Cyp40 από θηλαστικά έχει βρεθεί πως ρυθμίζει την δράση του μεταγραφικού παράγοντα c-Myb, ενώ η CypA συνδέεται με την YY1, έναν zink-finger αναστολέα της μεταγραφής και την Zpr1, μια zink-finger πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, η κυκλοφιλίνη B του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με την πεπτιδική ορμόνη προλακτίνη για να προάγει την μεταγραφή ενός εύρους γονιδίων.

1.1.1.β. Δομικές-βιοχημικές μελέτες κυκλοφιλινών από διαφορετικούς οργανισμούς

Οι κρυσταλλικές δομές αρκετών κυκλοφιλινών τόσο από προκαρυωτικούς, όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν λυθεί. Οι δομικές μελέτες έχουν αποκαλύψει σχέσεις δομής και λειτουργίας του ενζύμου, που δεν ήταν εξαρχής διακριτές.

Έτσι, η ανθρώπινη CyPA εμφανίζεται ως ένα αποτελούμενο από οκτώ ελάσματα β-βαρέλι, με δυο α-έλικες να το περικλείουν σε κάθε μια από τις δυο άκρες του. Επτά

αρωματικά και άλλα υδρόφοβα αμινοξέα αμινοξέα σχηματίζουν ένα συμπαγή υδρόφοβο πυρήνα μέσα στο βαρέλι, συνήθως στην περιοχή πρόσδεσης της CsA. Ένας βρόχος από την Lys118 έως την His126 και τέσσερα ελάσματα αποτελούν το σημείο πρόσδεσης της CsA. Η συνολική δομή της hCyPB είναι παρόμοια με την hCyPA, με τις μοναδικές διαφορές να εντοπίζεται στις περιοχές δυο βρόχων (αμινοξέα 19-24 και 152-164) και στο άμινο- και C-τελικό άκρο. Η CyPC έχει επίσης παρόμοια δομή με την hCyPA, διαφέροντας κυρίως στην διαμόρφωση τριών επιφανειακών βρόγχων. Η μεγάλη κυκλοφιλίνη CyP40 περιέχει μια περιοχή κυκλοφιλίνης με δομή παρόμοια της hCyPA συνδεδεμένη με επαναλαμβανόμενες περιοχές TPRs, οι οποίες απαντώνται σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με αντίδραση στο στρες. Δομικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η περιοχή TPR της CyP40 αποτελείται από επτά έλικες διαφόρων μηκών που απαρτίζεται από τρία TPR μοτίβα. Οι κρύσταλλοι της CyP40 σχηματίζονται σε δυο μορφές: στην μονοκλινική η καρβοξυλική περιοχή προεξέχει από το σώμα της TPR περιοχής ώστε να σχηματιστεί μια φορτισμένη έλικα, ενώ στην τετραγωνική μορφή δυο TPR έλικες ισιώνονται προς σχηματισμό μιας εκτεταμένης έλικας.

Στην φαρμακευτική βιομηχανία, η γνώση της τρισδιάστατης δομής μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης στόχου διευκολύνει την διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Αν και κατέχουν ευνοϊκές αναλυτικές ιδιότητες όπως υψηλή καθαρότητα και καθαρό σήμα στην σκέδαση φωτός, μερικές πρωτεΐνες δεν είναι ικανές για σχηματισμό κατάλληλων για συλλογή δεδομένων κρυστάλλων. Η ανθρώπινη κυκλοφιλίνη D έχει επιλεγεί ως πρωτεΐνη στόχος για την θεραπεία καρδιακών δυσλειτουργιών (Schlatter et al., 2005).

Η CyPJ είναι ένα μέλος της οικογένειας των CyP και η ανθρώπινη CyPJ είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο κυκλοφιλίνης από εμβρυϊκό ιστό ανθρώπινου εγκεφάλου, που παρουσιάζει 50% αμινοξική ομολογία με την ανθρώπινη CyPA. Η δευτεροταγής και τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης θυμίζει αυτήν την hCyPA, αλλά περιέχει μια επιπρόσθετη δισουλφιδική γέφυρα και 4 περιοχές τελείως διαφορετικές από εκείνες της hCyPA (Huang et al., 2005).

Η δομή της ανθρώπινης CyPA σε σύμπλοκο με το πεπτιδίο AAPF, επιλύθηκε και αποκάλυψε πως μόνο η *cis* μορφή του πεπτιδίου προσδένεται στο ένζυμο σε στοιχειομετρία 1:1. Μοριακή προσομοίωση έδειξε πως η *trans* μορφή του πεπτιδίου δεν

χωρά στερεοχημικά στο ενεργό κέντρο. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως η CyPA καταλύει την ισομερίωση ενός πεπτιδικού δεσμού προλίνης από την trans στην cis μορφή του. Βασιζόμενος σε αυτήν την θέση οι Zhao και Ke (1996) πρότειναν πως η Arg55 δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με το άζωτο για να επιτευχθεί αποσύζευξη του συντονισμού του αμιδικού δεσμού της προλίνης και να διευκολυνθεί η *cis-trans* αλληλομετατροπή.

Σύγκριση μεταξύ των συμπλόκων CyPA/CsA και CyPA/AlaPro υποδεικνύει ότι η CsA δεν είναι ένα χημικό ανάλογο του φυσικού υποστρώματος, επιβεβαιώνοντας πως η καταλυτική δράση της CYPA δεν σχετίζεται με τον ρόλο στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος είτε δομικά είτε λειτουργικά (Ke et al., 1994).

Τα ένζυμα των κυκλοφιλινών έχουν εκτενώς μελετηθεί και σε ζύμες. Πιο ειδικά, σε αντίθεση με τα αναμενόμενα πως οι υψηλά συντηρημένες κυκλοφιλίνες μπορεί να είναι απαραίτητες για το πρωτεϊνικό δίπλωμα, καμιά από τις οκτώ ανεξάρτητες κυκλοφιλίνες δεν φαίνεται να είναι απαραίτητες στην *S. cerevisiae*. Στην πραγματικότητα, η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών που δεν περιέχουν καμιά κυκλοφιλίνη έδειξε πως είναι βιώσιμα και ελάχιστη επίδραση επιφέρουν στην λειτουργία τους. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η Cpr1 παίζει ρόλο στην ρύθμιση της δράσης δυο διαφορετικών ιστονο-αποακετυλασών συμπλόκων (Sin3-Rpd3 και Set3C) και είναι απαραίτητη για την έναρξη των μεταγραφικών δραστηριοτήτων κατά την μετάβαση από την μιτωτική στην μειωτική κυτταρική διαίρεση στην αναπτυσσόμενη ζύμη. Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με το γεγονός πως η Cpr1 βρίσκεται σε αφθονία στον πυρήνα των κυττάρων ζύμης και αποκαλύπτει μια ξεκάθαρη επιλεκτική πίεση για διατήρηση υψηλής ομολογίας ενζύμων.

Η παθογόνα ζύμη *C. neoformans* έχει δυο παρόμοιες CypA πρωτεΐνες, Cpr1 και Cpr2. Σε αντίθεση με την βιωσιμότητα που επέδειξαν τα μεταλλαγμένα ως προς τα οκτώ γονίδια κυκλοφιλίνης στελέχη της *S. cerevisiae*, η Cpr1 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της *C. neoformans* σε υψηλές θερμοκρασίες και την πλήρη μετάδοση της μολυσματικότητας του μύκητα, ενώ η Cpr2 είναι διαθέσιμη για αυτές τις λειτουργίες μόνο παρουσία της Cpr1. Διαγραφή και των δυο γονιδίων οδηγεί στην ανάπτυξη ενός φαινότυπου ανίκανου για ανάπτυξη και μολυσματικότητα. Ο ρόλος των Cpr1 και Cpr2 υποθέτουμε πως είναι ανεξάρτητος από την λειτουργία της καλσινευρίνης, υπονοώντας

έτσι έναν καινούριο ρόλο για την κυκλοφιλίνη A στην ανάπτυξη και μολυσματικότητα του παθογόνου.

Εκτεταμένες έρευνες έχουν γίνει και στις κυκλοφιλίνες παρασίτων. Το *Leishmania donovani* είναι ένα διμορφικό πρωτόζωο υπεύθυνο για το καλά-αζάρ στον άνθρωπο. Αν και η κυκλοσπορίνη είναι τοξική για ένα μεγάλο εύρος παρασίτων (*Plasmodium*, *Schistosoma*), οι απόψεις για τις επιδράσεις της πάνω σε είδη του *Leishmania* είναι αντικρουόμενες. Τα είδη *L. major* και *L. donovani* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Αρχικά, η ανθεκτικότητα του *L. major* αποδόθηκε στην μετάλλαξη της Arg69 από την ανθρώπινη CyPA σε Asn69 στην αντίστοιχη θέση στο ένζυμο του παρασίτου, καθώς η αργινίνη στην συγκεκριμένη θέση φαίνεται να είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του συμπλόκου κυκλοφιλίνης-κυκλοσπορίνης στην καλσινευρίνη. Πανομοιότυπες μεταλλάξεις στις κυκλοφιλίνες των *Toxoplasma gondii* και *Plasmodium falciparum* έχουν ωστόσο επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα, καθώς και τα δυο ένζυμα ήταν ευαίσθητα στο φάρμακο. Μελέτες έχουν δείξει πως η ανθεκτικότητα του φαρμάκου στο *L. donovani* αποδίδεται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης στο παράσιτο που οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της κυκλοσπορίνης (Venugopal et al., 2007).

Η αντίσταση του ανθρώπινου παράσιτου *Brugia malayi* στην αντιπαρασιτοκτόνο δράση της CsA μπορεί να προέρχεται από την παρουσία κυκλοφιλινών με χαμηλή συγγένεια ως προς το φάρμακο. Η χαμηλή συγγένεια της *BmCYP-1* με την CsA προέρχεται από την διαφορετική διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Ellis et al., 2000).

Η *LdCyP* που εδράζει στο ΕΔ ενεργοποιεί την κινάση της αδενοσίνης (AdK). Αυτή η δράση της *LdCyP* πάντως απεμπολείται σε υψηλή ιοντική ισχύ, όχι όμως και σε μη ιονικούς διαλύτες. Η δομική μελέτη του ενζύμου αποκάλυψε αρκετά υδρόφοβα και φορτισμένα αμινοξέα εκτεθειμένα στον διαλύτη. Πειράματα, με κατευθυνόμενες μεταλλάξεις έδειξαν την σημασία του θετικά φορτισμένου αμινοξικού κατάλοιπου R147 στην αλληλεπίδραση *LdCyP*-AdK (Sen et al., 2007).

Η θεραπεία της σχιστοσωμίας, μιας ευρέως διαδεδομένης ασθένειας που προκαλείται από το παρασιτικό σκουλήκι του γένους *Schistosoma*, επαφίεται κυρίως στην δράση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα, praziquantel, αν και υπάρχουν και

πολλές άλλες ενώσεις που παρουσιάζουν αντιπαρασιτικές δράσεις. Μια τέτοια ένωση είναι η CsA, που έχει βρεθεί να μειώνει τον πληθυσμό των σκουληκιών σε ποντίκια μολυσμένα με *Schistosoma mansoni*. Η οξειδωμένη μορφή της SmCypA περιέχει μια δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των δυο κυστεϊνών (Cys-122 και Cys-126) του καρβόξυ-τελικού άκρου. Αυτό είναι το πρώτο παράδειγμα κυκλοφιλινών με δισουλφιδική γέφυρα. Δομικές μελέτες πρότειναν έναν μηχανισμό ρύθμισης της δράσης της SmCypA μέσω οξειδωσης των θειολικών ομάδων. Στην πράξη, όταν η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου είναι ανενεργή, η ανηγμένη παρουσιάζει ικανοποιητική δράση ισομεράσης σε νανομοριακό επίπεδο. Το γεγονός πως το ζεύγος κυστεϊνών δεν είναι συντηρημένο στην υπεροικογένεια των κυκλοφιλινών, η εγγύτητά τους στο ενεργό κέντρο και η σημασία των θειολικών ομάδων στην δράση ισομεράσης προλίνης καθιστούν αυτό το δομικό χαρακτηριστικό ιδιαίτερος ελπιδοφόρο στην ανάπτυξη διαφορετικών και πιο αποτελεσματικών παρεμποδιστών σχιστοσωμίας (Gourlay et al., 2007).

Στον ελεύθερης διαβίωσης νηματώδη σκόληκα *Caenorhabditis elegans* εκφράζονται 18 κυκλοφιλίνες, οκτώ από τις οποίες είναι συντηρημένες και σχηματίζουν δυο τύπου B μορφές (CYP-5 και CYP-6). Η δομή της CYP-5 θυμίζει την ανθρώπινη CypB. Η δράση ισομεράσης έχει μετρηθεί για το υπόστρωμα suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA και βρέθηκε $k_{cat}/K_m = 3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, δηλαδή όσο περίπου και της hCypB ($6.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Η CYP-6 παρουσιάζει 67% αμινοξική ομοιότητα με την CYP-5. Τα δυο ένζυμα μοιάζουν δομικά, με το πρώτο να εμφανίζει αυξημένο αριθμό αρνητικών φορτίων διασκορπισμένων στην επιφάνειά του. Η χωρική έκφραση των δυο πρωτεϊνών μελετήθηκε με την χρήση διαγονιδιακών ζώων που περιείχαν το γονίδιο αναφοράς LacZ συντηγμένο στα γονίδια τους και έδειξε πως εκφράζονται στην κοιλία του σκουληκιού (Picken et al., 2002).

Η περιπλαστική μορφή του ενζύμου έχει μελετηθεί κυρίως σε βακτήρια. Η δομή της περιπλαστικής κυκλοφιλίνης από το *E. coli* έχει επιλυθεί με NMR. Τέσσερις περιοχές κοντά στο ενεργό κέντρο διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την κυτταροπλασματική μορφή του ενζύμου και ίσως καθορίζουν την εξειδίκευση στην πρόσδεση του υποστρώματος, την ευαισθησία στην κυκλοσπορίνη και την αναλογία φαρμάκου προς πρωτεΐνη που απαιτείται στην επιφάνεια για παρεμπόδιση πρόσδεσης της καλσινευρίνης (Clubb et al., 1994).

Η PpiA από το *Mycobacterium tuberculosis* έχει χαρακτηριστεί ($k_{cat}/K_m = 2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) και επιλυθεί. Το ενεργό κέντρο φαίνεται να παρουσιάζει την ίδια εξειδίκευση για υποστρώματα και την κυκλοσπορίνη A με τα ένζυμα της ίδιας οικογένειας. Ωστόσο, το PpiB ένζυμο φαίνεται να διαφέρει (Henriksson et al., 2004).

Τέλος, η CyPA αλληλεπιδρά με το ισοσμάτιο του ιού HIV-1 μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης με την περιοχή του καψιδίου της ιικής πολυπρωτεΐνης Gag. Η καψιδική ακολουθία $^{87}\text{HAGPIA}^{92}$ περικλείει το ενεργό κέντρο της CyPA και σχηματίζει σύμπλοκο που μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Σε αντίθεση με τις *cis* προλίνες των πεπτιδίων στα σύμπλοκα της κυκλοφιλίνης που έχουν μελετηθεί ως τώρα, η προλίνη αυτού του πεπτιδίου, Pro90, υιοθετεί την *trans* διαμόρφωση. Σύγκριση με δομές κυκλοφιλίνης σε σύμπλοκο με μεγαλύτερα κλάσματα του πρωτεϊνικού καψιδίου του ιού έδειξαν πως η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τα αμινοξέα Ala(Val) 88, Gly 89 και Pro 90 και είναι ανεξάρτητη από το μέγεθος του ιού (Vajdos, et al., 1997).

Ο μηχανισμός δράσης των κυκλοφιλινών αν και μελετημένος για χρόνια, προκαλεί ακόμη και σήμερα σύγχυση, αφού μέχρι πρόσφατα δεν ήταν διαθέσιμες δομές με τον ίδιο προσδέτη, η προλίνη του οποίου να εντοπιζόταν στην *cis* ή *trans* διαμόρφωση. Οι δομές για το σύμπλοκο της κυκλοφιλίνης A και μεταλλάξεων του καψιδίου του ιού HIV-1 με προσδέτες και στις δυο διαμορφώσεις οδήγησαν στην ανάπτυξη της θεωρία ενός μηχανισμού όπου το άμινο τελικό άκρο του προσδέτη περιστρέφεται κατά την *cis-trans* ισομερίωση. Ωστόσο, κάποια χρόνια νωρίτερα, είχε προταθεί ένας άλλος μηχανισμός, βάση πειραμάτων NMR, σύμφωνα με τον οποίο το καρβόξυ τελικό άκρο είναι αυτό που περιστρέφεται. Πειράματα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής στα οποία επιχειρήθηκε να ανακτηθεί η *trans* μορφή της προλίνης ξεκινώντας από την *cis* μορφή, έδειξαν η συγκεκριμένη δομή, στην οποία περιστράφηκε το άμινο τελικό άκρο κατά την προσομοίωση, παρουσιάζει συμφωνία τόσο με την κρυσταλλική δομή όσο και με αποτελέσματα του NMR (Trzesniak & Van Gunsteren, 2006).

Η πρωτεΐνη του καψιδίου του HIV-1 σχηματίζει μια κωνική κατασκευή στο κέντρο του ώριμου ισοσμάτιου. Το καψίδιο προσδένεται παράλληλα στην κυκλοφιλίνη βοηθώντας την να πακεταριστεί στο ισοσμάτιο. Η κυκλοφιλίνη δρα κατά την αναπαραγωγή του HIV-1, πιθανώς συνδράμοντας στην αποσυναρμολόγηση του καψιδίου κατά την μόλυνση. Η κρυσταλλική δομή της περιοχής του καψιδίου στο άμινο

τελικό άκρο σε σύμπλοκο με την CypA έχει επιλυθεί. Ένας βρόχος του καψιδίου που προεξέχει προσδένεται στο ενεργό κέντρο, με την Pro90 να βρίσκεται στην trans μορφή της. Η δομή υποδεικνύει πως η CypA δρα ως εξειδικευμένη πρωτεΐνη πρόσδεσης και ως μη εξειδικευμένη ισομεράση. Στην κρυσταλλική δομή, μόρια του καψιδίου συναρμολογούνται σε συνεχείς επίπεδες λωρίδες. Η συνένωση αυτών των λωρίδων επιτρέπει την δημιουργία επιφανειών γύρω από τον ιό. Η CypA δρα προσπαθώντας να αποδυναμώσει την συνένωση μεταξύ των λωρίδων και συνεπώς συμβάλλει στην αποσυναρμολόγηση του περιβλήματος (Gamble et al., 1996).

1.1.2. Οι οικογένειες των FKBP's και Παρβουλινών

Τα μέλη της οικογένειας των FKBP's κυμαίνονται σε μέγεθος από 12 ως 52 kDa και απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς. Η FKBP12 (12kDa) εκφράζεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα και εμφανίζει δράση ισομεράσης προλίνης, η οποία παρεμποδίζεται από τις μακρολίδες FK506 και ραπαμυκίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Harrar et al., 2001).

Η FKBP12 αποτελείται από 108 αμινοξέα, τα οποία εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντηρητικότητας π.χ. ομολογία σε άνθρωπο και κουνέλι 100% και άνθρωπο και ποντίκι 95%. Η ανθρώπινη FKBP12 προσδένεται στην FK-506 με τιμή για την K_D 0,4 nM και για την ραπαμυκίνη 0,2 nM. Πρόσφατα αποδείχθηκε ο ρόλος της ως στοιχείο του συμπλόκου που εμπλέκεται στο κανάλι ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης ασβεστίου.

Η FKBP13 εντοπίζεται στο ΕΔ και εμφανίζει 43% ομολογία με την FKBP12. Η πρωτεΐνη από ζύμη περιέχει μια υδρόφοβη ακολουθία σήματος στο N-τελικό άκρο, ενώ στο C-τελικό άκρο εντοπίζεται η ακολουθία σήματος για την μεταφορά στο ΕΔ. Η 25-kDa πρωτεΐνη FKBP25, που είναι εξειδικευμένη για την ραπαμυκίνη απομονώθηκε από κύτταρα εγκεφάλου, σπλήνας και αδένες του θύμου. Ωστόσο, ενώ και η FK506 και η ραπαμυκίνη προσδένονται και παρεμποδίζουν εξίσου της δράση ισομεράσης της FKBP12, η FKBP25 μόσχου παρουσιάζει προτίμηση στην ραπαμυκίνη κατά 200 φορές σε σχέση με την FK506.

Σε αντίθεση με τις κυκλοφιλίνες και τις FKBP's, ένας περιορισμένος αριθμός παρβουλινών ή ομολόγων τους είναι γνωστός σήμερα. Η πρώτη παρβουλίνη (Par 10 ή

PPiC) απομονώθηκε αρχικά από το *E.coli* και εμφανίζει ένα μοριακό βάρος 10.1 kDa (η ονομασία παρβουλίνη προέρχεται από την Λατινική λέξη *parvus*=μικρός). Η SurA είναι μια ομόλογη της Par10 πρωτεΐνη στο *E.coli*, που εντοπίζεται στο περίπλασμα του βακτηρίου και είναι απαραίτητη για την επιβίωσή του κατά την σταθερή φάση ανάπτυξης. Έχει βρεθεί πως η SurA βοηθά στο δίπλωμα των OMPs (outer membrane proteins) και προάγει το δίπλωμα άλλων ασταθών πρωτεϊνών. Ενώ εμφανίζει μικρή δράση ισομεράσης προλίνης, η SurA δρα ως τσαπερόνιο στο περίπλασμα.

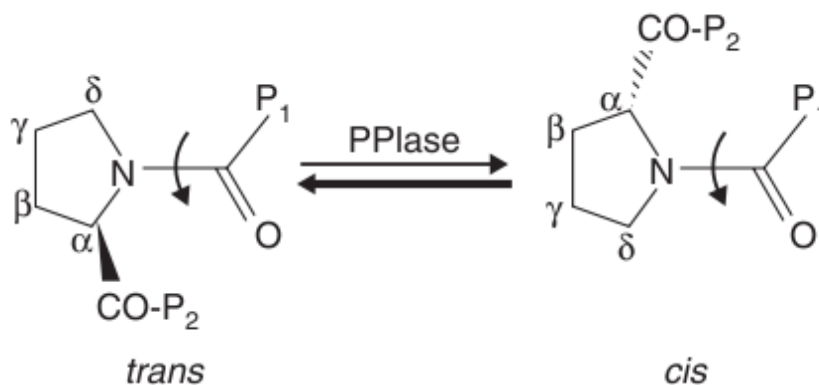
Δυο βασικά ομόλογα παρβουλίνης εντοπίζονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα: η ανθρώπινη Pin1 και η ομόλογή της σε αναπτυσσόμενα κύτταρα ζύμης Ess1, δρουν ως ρυθμιστές στον μιτωτικό κύκλο του κυττάρου. Η Pin1 είναι ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 163 αμινοξέα που στο N-τελικό άκρο περιέχει μια ακολουθία που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες (WW περιοχή). Στο C-τελικό άκρο, εντοπίζεται η περιοχή δράσης ισομεράσης προλίνης.

1.1.3. Η δράση *cis/trans* ισομεράσης προλίνης

Τα πειράματα μελέτης της δράσης ισομεράσης προλίνης αρχικά βασίζονταν στην πρωτεόλυση συγκεκριμένων ισομερών με την χρήση τροποποιημένων πεπτιδίων. Στα πεπτίδια, που περιέχουν προλίνη ένα 10% των πεπτιδικών δεσμών του αμινοξέος έχουν την ασυνήθιστη *cis* διαμόρφωση. Ωστόσο, οι περισσότερες πρωτεάσες κόβουν εξειδικευμένα πεπτίδια, που υιοθετούν την *trans* διαμόρφωση κι έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να διαταράξουν την *cis-trans* ισορροπία των ισομερών προλίνης. Τα πιο κοινά υποστρώματα είναι της μορφής suc-AXaaPF-pNA, με Xaa να είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Σε αυτήν την περίπτωση η α -χυμοθρυψίνη χρησιμοποιείται ως πρωτεάση. Με μια ταχεία αντίδραση ο δεσμός μεταξύ της Φαινυλαλανίνης και του pNA κόβεται και απελευθερώνεται το χρωμοφόρο 4-νιτροανιλίδιο. Η αργή ισομερίωση από *cis* σε *trans* των πεπτιδικών δεσμών προλίνης καταγράφεται στα 390nm από την πρωτεόλυση.

Τα περισσότερα πειράματα προσδιορισμού της κινητικής σταθεράς της κατάλυσης γίνονται με αυτού του τύπου τα πεπτίδια. Η μελέτη των *Gothel et al.* καταδεικνύει πως οι ισομεράσες προλίνης εμφανίζουν ενζυμικές ιδιότητες που

ταιριάζουν στην καταλυτική τους δράση. Ωστόσο, μόνο μια κατεύθυνση της αντιστρεπτής αντίδρασης (ισομερίωση από *cis* σε *trans*) μπορεί να ακολουθηθεί. Επιπροσθέτως, παρουσιάζονται ορισμένοι περιορισμοί, όπως i) η κινητική μελέτη πραγματοποιείται μόνο κάτω από συνθήκες μη ισορροπίας ii) μόνο η ισομερίωση από *cis* σε *trans* και όχι η αντίστροφη μπορεί να μελετηθεί και iii) προϊόντα από την πρωτεόλυση μπορεί να επηρεάσουν την δράση ισομεράσης. Λόγω του γεγονότος πως μόνο το 10% των υποστρωμάτων (*cis* υπόστρωμα) μπορεί να παρατηρηθεί, ο θόρυβος καθώς και η διαλυτότητα των πεπτιδίων μπορεί να προκαλέσει προβλήματα. Η ανακάλυψη πως η ποσότητα των *cis* ισομερών στα υποστρώματα μπορεί να μετατοπιστεί έως 70% σε διάλυμα τριφθοροαιθανόλης (TFE) που περιέχει 0,47 M LiCl μπόρεσε να μειώσει τον θόρυβο σε τέτοια πειράματα (Kofron et al., 1991). Αυτό ήταν σημαντικό στον καθορισμό των σταθερών Michaelis και ρυθμών μετατροπής των ισομερασών προλίνης (Σχήμα 1.3.).



Σχήμα 1.3. Η ισομερίωση *cis* –*trans* πεπτιδικού δεσμού που συμμετέχει αμινοξικό κατάλοιπο προλίνης

Οι παραπάνω μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση των πεπτιδίων. Αντιθέτως, η θεωρούμενη *in vivo* λειτουργία των ισομερασών προλίνης περιλαμβάνει ισομερίωση προλίνης με υπόστρωμα πρωτεΐνη ως τμήμα των διαδικασιών του διπλώματος και της μεταγωγής σήματος. Ένα βήμα προς την κατεύθυνση της γεφύρωσης του χάσματος μεταξύ των *in vitro* κινητικών μελετών και της *in vivo* λειτουργίας είναι η ανάλυση της επιτάχυνσης του πρωτεϊνικού διπλώματος με την προσθήκη του ενζύμου.

1.1.4. Καταλυτικός Μηχανισμός Ισομερασών

Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί, που συνοψίζονται από τους Zhao & Ke (1996).

Στον μηχανισμό του ομοιοπολικού τετραεδρικού ενδιάμεσου, μια κυστεΐνη ή ένα νουκλεόφιλο αμινοξύ σχηματίζει ένα ομοιοπολικό δεσμό με τον άνθρακα του καρβονυλίου ως ενδιάμεσο μόριο. Ωστόσο, κατευθυνόμενες μεταλλάξεις και δομές προερχόμενες από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δεν αποκάλυψαν κανένα υποψήφιο νουκλεόφιλο αμινοξύ κοντά στον αμιδικό δεσμό. Έτσι, αυτός ο μηχανισμός μπορεί να απορριφθεί.

Ένας δεύτερος μηχανισμός, «κατάλυση μέσω παραμόρφωσης» στον οποίο το επίπεδο N-C=O παραμορφώνεται με την πρόσδεση στην CyP και το ενδιάμεσο μόριο σταθεροποιείται με την αλληλεπίδραση με την CyP. Ο μηχανισμός στηρίχθηκε στην επίδραση ισοτόπων, αλλά δεν προτάθηκε καμιά χημική ομάδα που να σταθεροποιεί το ενδιάμεσο σύμπλοκο.

Ένας τρίτος μηχανισμός υποθέτει πως η πλευρική αλυσίδα της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης πρωτονιώνεται ή δημιουργεί δεσμό H με το ιμιδικό άζωτο για να αποσυζευχθεί ο O=C-N αμιδικός δεσμός. Υπολογισμοί στα μοριακά τροχιακά αποκαλύπτουν πράγματι πως πρωτονίωση του αζώτου χαμηλώνει την ενεργειακό φράγμα για την *cis-trans* αλληλομετατροπή.

Ένας τέταρτος μηχανισμός της «κατάλυσης μέσω αποσυμπλοκοποίησης» βασίζεται στην παρατήρηση πως ο ρυθμός της ισομερίωσης αυξάνεται ραγδαία σε μη πολικούς διαλύτες. Ο υδροφοβικός χαρακτήρας του ενεργού κέντρου ενισχύει αυτήν την υπόθεση.

Τέλος, ο μηχανισμός που βασίζεται στον διαλύτη προτάθηκε βάση της δομής του συμπλόκου CyPA/Ala-Pro. Αυτός ο μηχανισμός προβλέπει δυο στάδια στην κατάλυση: αποσυμπλοκοποίηση κατά την σύνδεση στην υδρόφοβη κοιλότητα του ενεργού κέντρου και σταθεροποίηση του ενδιάμεσου μορίου μέσω μορίων του διαλύτη.

Γενικά, ο C-N αμιδικός δεσμός είναι συζευγμένος με την καρβονυλική ομάδα ώστε να αποδώσουν έναν επίπεδο χαρακτήρα στον αμιδικό δεσμό. Αυτή η σχέση δίνει

στον C-N δεσμό χαρακτηρίσει διπλό δεσμό, κι έτσι η ισομερίωση της προλίνης πρέπει να υπερβεί το ενεργειακό φράγμα για να πραγματοποιηθεί. Κάθε παράγοντας που συμβάλλει στην εξασθένιση του χαρακτήρα του διπλού δεσμού του C-N αναμένεται να επιταχύνει την ισομερίωση (Zhao & Ke, 1996).

Η σύγκριση ανάμεσα στις δομές του συμπλόκου της κυκλοφιλίνης A με τα διπεπτιδία Ser-Pro, His-Pro και Gly-Pro αποκάλυψε πως στα παραπάνω σύμπλοκα η διαμόρφωση και ο τρόπος σύνδεσης των πεπτιδίων είναι σχεδόν παρόμοιος. Η πλευρική αλυσίδα του N-τελικού άκρου των πεπτιδίων δεν αλληλεπιδρά έντονα με την κυκλοφιλίνη, γεγονός που καταδεικνύει την μικρή συνεισφορά στην *cis-trans* ισομερίωση και συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην καταλυτική εξειδίκευση του ενζύμου με ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Η πρόσδεση των διπεπτιδίων είναι παρόμοια με εκείνη του συνθετικού τετραπεπτιδίου suc-AAPF-pNa όσον αφορά το δίκτυο των υδρογονικών δεσμών στο N-τελικό άκρο και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της πλευρικής αλυσίδας της προλίνης. Ωστόσο, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται 1) στο δίκτυο των υδρογονικών δεσμών του καρβοξυλικού άκρου των πεπτιδίων και της Arg55 και μεταξύ Arg55 και Gln63, 2) στην διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας της Arg55 και 3) στην πρόσδεση των νερών στο ενεργό κέντρο. Αυτές οι διαφορές υπονοούν πως είτε αυτά τα διπεπτιδία δεν είναι υποστρώματα αλλά ανταγωνιστικοί παρεμποδιστές της ισομερίωσης της προλίνης ή ότι τα διπεπτιδία εμπλέκονται σε διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς από τα τετραπεπτιδία (Zhao & Ke, 1996).

Οι κυκλοφιλίνες καταλύουν την ισομερίωση προλίνης από την *trans* στην *cis* μορφή της συμβάλλοντας στην διαδικασία της αναδίπλωσης των μη διπλωμένων πρωτεϊνών επαναφέροντας την προλίνη τους στην αρχική φυσική *cis* κατάστασή της. Μόνο μικρά πεπτιδία με την *cis* διαμόρφωση έχουν παρατηρηθεί δομικά σε σύμπλοκα με κυτταροπλασματικές κυκλοφιλίνες. Ωστόσο, οι δομές συνθετικών πεπτιδίων που περιέχουν *trans* προλίνες σε σύμπλοκα με μεταλλαγμένη K163T *EcCyPB* έχουν επιλυθεί. Η σύγκρισή τους με τις δομές των πεπτιδίων με *cis* προλίνη στα σύμπλοκα με *EcCyPA* καταδεικνύουν πως α. και στις δυο περιπτώσεις ο δακτύλιος της προλίνης εισέρχεται στον υδρόφοβο θύλακα και ο δεσμός H μεταξύ της CO ομάδας της προλίνης και του ατόμου N^{H2} της αργινίνης σταθεροποιεί το πεπτίδιο. Από την άλλη, στην περίπτωση της *cis* προλίνης ο σχηματισμός δυο δεσμών H της NH και CO της αλανίνης

που προηγείται της προλίνης του πεπτιδίου με την πρωτεΐνη σταθεροποιούν το πεπτίδιο, ενώ, στην περίπτωση της *trans* προλίνης ο δεσμός Η μεταξύ της CO που προηγείται του Ala-Pro και του N^{ε2} της His47 μέσω γέφυρας νερού επιτρέπουν μεγάλη παραμόρφωση στην διευθέτηση της Ala στο Ala-Pro. Αν και η απώλεια του διπλού δεσμού του αμιδικού δεσμού Ala-Pro είναι απαραίτητη για την ισομερίωση που συμβαίνει με την περιστροφή γύρω από τον δεσμό, αυτά τα πεπτίδια έχουν μορφές που είναι αδύνατο να εκτελέσουν μεταφορά πρωτονίου από την γουανιδυλική ομάδα της αργινίνης στο άτομο N της προλίνης, επάγοντας την απώλεια του χαρακτήρα του διπλού δεσμού (Konno et al., 2004).

1.1.5. Το βακτήριο *Azotobacter vinelandii*

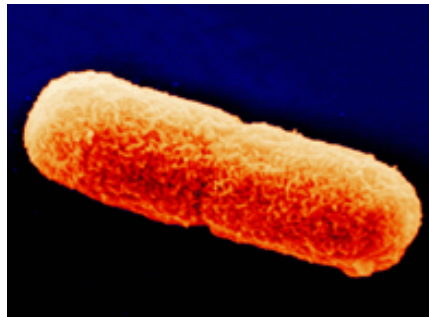
Το *Azotobacter vinelandii* (σχήμα 1.4.) είναι ένα γάμμα-πρωτεοβακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* (Rediers et al., 2004). Είναι ένας αερόβιος οργανισμός, που διαβιεί στο έδαφος και εμφανίζει μια πληθώρα μεταβολικών ιδιοτήτων, μεταξύ των οποίων την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέποντας το σε αμμωνία. Είναι ένας ελεύθερης διαβίωσης οργανισμός, που παράγει πολλές φυτορμόνες και βιταμίνες στο έδαφος. Όπως συμβαίνει και στην *Klebsiella pneumoniae* δεσμεύει το άζωτο ενώ διαβιεί ελεύθερο στο έδαφος και δεν συμβιώνει με φυτά (διαδικασία που συναντάται στα μέλη του γένους *Rhizobium* και σε ποικιλίες ψυχανθών φυτών).

Δυο σημαντικά βιολογικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει το *A. vinelandii* κατά την διαδικασία αζωτοδέσμευσης είναι α. η ικανότητα σύνθεσης εναλλακτικών ενζύμων νιτρογενάσης (που δεν περιέχουν μολυβδαίνιο αλλά βανάδιο ή μόνο σίδηρο) και β. η ικανότητα να δεσμεύει άζωτο αερόβια παρά την δεδομένη ευαισθησία του ενζύμου στο οξυγόνο.

Είναι ένα γενετικά ανιχνεύσιμο σύστημα, που χρησιμοποιείται για την μελέτη της αζωτοδέσμευσης. Τα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργούνται και μεγαλώνουν σχετικά εύκολα. Κατά καιρούς, έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για βιοχημικές αναλύσεις εξαιτίας της εκπληκτικής απόδοσης και ποιότητας των ενζύμων που μπορεί να απομονωθούν από τον μικροοργανισμό. Επιπρόσθετα, παρέχει ένα ιδανικό σύστημα για

την μελέτη των διαδικασιών του σχηματισμού κύστης και ξενοβιοτικής αποδόμησης (Sadoff, 1975).

Το πλήρες γονιδίωμα του βακτηρίου έχει αποκωδικοποιηθεί. Δυο γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν για την κυκλοφιλίνη υπάρχουν στο *A. vinelandii*: η κυταροπλασματική μορφή του ενζύμου *AnPPIB* (γνωστή και ως *AnCyPA*) και η περιπλασματική μορφή *AnPPIA* (γνωστή και ως *AnCyPB*). Ωστόσο, καμία κυκλοφιλίνη από το συγκεκριμένο βακτήριο δεν έχει μελετηθεί δομικά.



Σχήμα 1.4. Το βακτηρίδιο *Azotobacter vinelandii*. Πηγή: The *Azotobacter vinelandii* genome project (www.azotobacter.org). Φωτογραφία από τον Richard Pau.

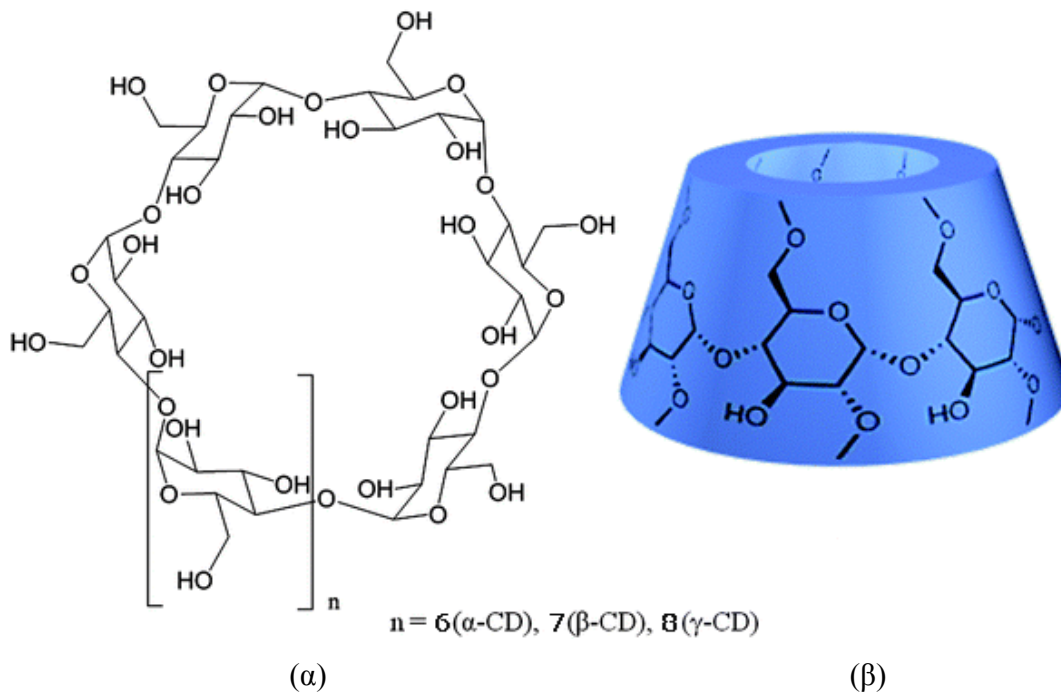
1.2. Κυκλοδεξτρίνες-Προϊόντα εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες (native CDs) είναι κυκλικά, υδατοδιαλυτά, μη-αναγωγικά πολυμερή αποτελούμενα από μακροκυκλικούς υδατάνθρακες. Αποτελούνται από μονάδες α -(1-4)-D γλυκοπυρανόζης, τοποθετημένες σε έναν κυκλικό σχηματισμό (Σχήμα 1.5.α.). Τα πιο κοινά από αυτά τα φυσικά μόρια είναι η α -, β - και γ - CD, που σχηματίζονται από έξη, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα, και σχηματίζουν κοιλότητες διαμέτρου 0.6, 0.8 και 1.0 nm. Η ύπαρξη μικροδιαφορών στις αναφερόμενες διαμέτρους της κεντρικής κοιλότητας και της περιφέρειάς τους καθιστούν τα μόρια μια ενδιαφέρουσα τάξη στο πεδίο της μακροκυκλικής και υπερμοριακής χημείας και αποτελούν ίσως το κλειδί για την κατανόηση της διαδικασίας συμπλοκοποίησης.

Ως παράγωγα αμύλου είναι μη-τοξικά συστατικά, δεν απορροφώνται από το γαστρεντερικό σύστημα και μεταβολίζονται πλήρως από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Παράλληλα, οι α -, β - και γ -CDs έχουν λάβει την ένδειξη ασφαλή GRAS (US FDA) για χρήση ως πρόσθετα σε τρόφιμα (Lina & Bär, 2004), (Bellringer et al., 1995), (Til & Bär, 1998).

Οι CDs παράγονται από άμυλο και α -1,4 γλυκάνες με την διαμεσολάβηση ενζύμων (αποικοδόμηση και κυκλοποίηση), όπως οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες των CDs (CGTase) και λιγότερο οι α -αμυλάσες. Ως υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφορες πηγές αμύλου, αλλά κυρίως προτιμάται το άμυλο καλαμποκιού (corn) και πατάτας. Το άμυλο από καλαμπόκι (maize) και στάρι επίσης χρησιμοποιούνται, αλλά περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό αμυλόζης, το οποίο δίνει μικρότερες αποδόσεις σε CDs από ότι η αμυλοπηκτίνη. Οι CGTases απομονώνονται από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως στελέχη *Bacillus* sp. (*B. amylobacter*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, αλκαλόφιλα στελέχη *Bacillus* sp.), *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Thermoanaerobacter* sp., *Clostridium* sp., κ.α. Η πρόοδος της βιοτεχνολογίας με τις γενετικά τροποποιημένες CGTases, καθώς και άλλες τεχνολογικές και επιστημονικές καινοτομίες έκαναν τις υψηλής καθαρότητας α -, β - και γ - CDs διαθέσιμα συστατικά τροφίμων και φαρμάκων. Σήμερα, παράγονται βιομηχανικά, με μια ετήσια παραγωγή για

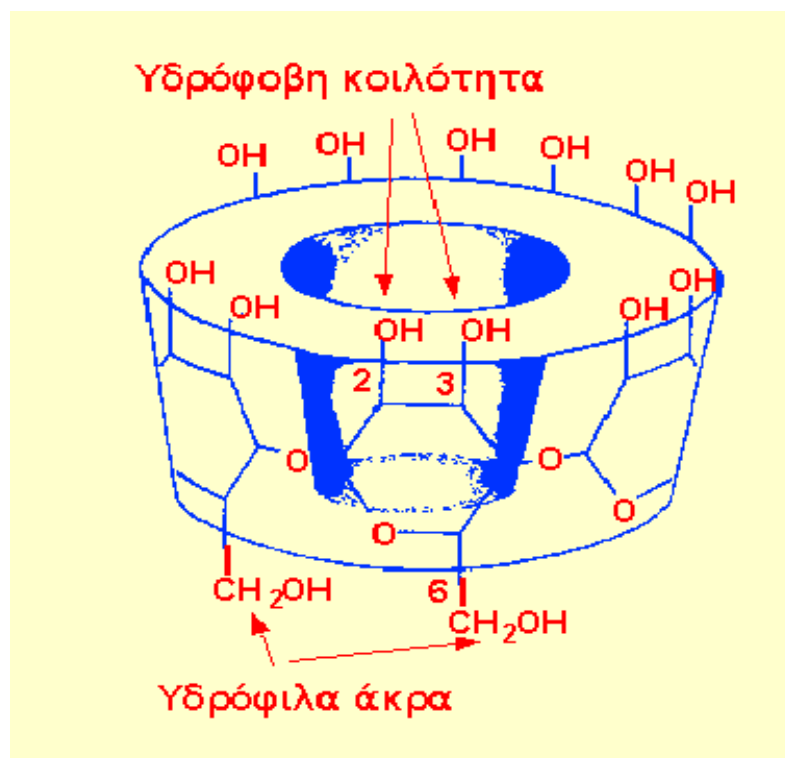
την β -CD της τάξης των 10.000 τόνων και τρέχουσα τιμή για την β -CD ως συστατικό τροφίμων πολύ λογική (5US\$ ανά kg).



Σχήμα 1.5.α. Η χημική και β. η τρισδιάστατη δομή των φυσικών κυκλοδετρινών

Οι CDs έχουν σχήμα κώλου (Σχήμα 1.5.β.), όπου οι δευτεροταγείς υδροξυλομάδες των ατόμων C2 και C3 της γλυκόζης εντοπίζονται στην φαρδιά πλευρά του κώλου (δευτεροταγής πλευρά), ενώ εκείνες των C6 ατόμων είναι τοποθετημένες στην στενή πλευρά του (πρωτοταγής πλευρά). Τα άτομα H1, H2 και H4 των C-H ομάδων, που είναι τοποθετημένα στο εξωτερικό της κοιλότητας του μορίου και οι πολικές υδροξυλομάδες των σακχάρων που είναι διευθετημένες επίσης προς το εξωτερικό του κώλου προσδίδουν στις εξωτερικές επιφάνειες των προσόψεων των CDs υδρόφιλο χαρακτήρα. Αυτή η διασπορά των πολικών ομάδων παρέχει την υδατοδιαλυτότητα σε αυτά τα υλικά. Το εσωτερικό του κώλου προσφέρει ένα περιβάλλον χαμηλότερης πολικότητας από εκείνο του νερού και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως «υδρόφοβη κοιλότητα», που ορίζεται στα δυο άκρα από τους δακτυλίους των C-H ομάδων (H3 και H5) και στη μέση από εκείνον των οξυγόνων-γεφυρών των γλυκοζιτικών μονάδων, «αιθερικά οξυγόνα» (O4 και O5). Τα H6 σχηματίζουν το

στενότερο άκρο του κώλουρου κώνου (Σχήμα 1.6.). Το αποτέλεσμα αυτής της διττής ιδιότητας είναι πως οι CDs μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά, αναστρέψιμα προϊόντα εγκλεισμού με ενώσεις χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, συμβάλλοντας στην αύξηση της τελευταίας σε αυτές τις ενώσεις.



Σχήμα 1.6. Οι υδρόφοβες και οι πολικές περιοχές των κυκλοδεξτρινών

Προκειμένου να βελτιωθεί η υδατοδιαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών (ιδιαίτερα της β -CD), αλλά και η εκλεκτικότητά τους στον ξενισμό συγκεκριμένων βιοδραστικών ουσιών (φαρμακευτικού κυρίως ενδιαφέροντος), συντίθενται παράγωγά τους, που προκύπτουν από τροποποίησή τους μέσω αλκυλίωσης και υδροξυαλκυλίωσης. Οι υδροξυλομάδες των C2, C3 και C6 είναι τα πιθανά σημεία τροποποίησης, ώστε να μένει ανέπαφη η υδρόφοβη κοιλότητα. Οι υδροξυλομάδες των C6 είναι οι πιο δραστικές σε σχέση με εκείνες των C2 και C3 και κατά συνέπεια δημιουργούνται παράγωγα με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και βελτιωμένη ικανότητα εγκλεισμού διαφόρων μορίων.

1.2.1. Εγκλεισμός και δημιουργία προϊόντων εγκλεισμού

Το προϊόν εγκλεισμού είναι μια ξεχωριστή μορφή χημικού συμπλόκου καθώς αυτός ο τύπος σχηματισμού συμπλόκου δεν εξαρτάται από ιοντικούς, ομοιοπολικούς δεσμούς (όπως συμβαίνει συνήθως στην χημική συμπλοκοποίηση), κατά την οποία ένα μόριο εγκλείεται μέσα σε ένα άλλο μόριο ή συσσωμάτωμα μορίων. Το βασικό κριτήριο είναι το εγκλεισμένο ή «ξενιζόμενο» μόριο να είναι κατάλληλου μεγέθους και σχήματος (π.χ. το καταλληλότερο για να πληρώνει το χώρο) ώστε να ταιριάζει με την κατάλληλη διαμόρφωση στην κοιλότητα των μορίων-«ξενιστών» (Marques, 2010).

Η στερεοχημεία, και πιθανόν, η πολικότητα τόσο του ξενιστή όσο και του ξενιζόμενου μορίου καθορίζουν την επίτευξη ή μη του εγκλεισμού. Επομένως, η συμπλοκοποίηση είναι ένα στερεοεξειδικευμένο φαινόμενο, όπου οι χωρικές απαιτήσεις για τον σχηματισμό ενός προϊόντος εγκλεισμού σε CDs θυμίζουν εν μέρει τον μηχανισμό «κλειδιού-κλειδαριάς» της ενζυμικής κατάλυσης. Πολλές φορές, ο εγκλεισμός στην κοιλότητα των CDs γίνεται έτσι ώστε το ξενιζόμενο μόριο να συγκρατείται εντός της μερικώς, παρεμποδίζοντας κάποιες ενεργές θέσεις του και εκθέτοντας άλλες.

Οι CDs μπορεί να περιγραφούν ως παράγοντες νανο-εγκλωβισμού και η δημιουργία συμπλόκου ισοδυναμεί με μοριακό εγκλεισμό, καθώς τα ξενιζόμενα μόρια απομονώνονται το ένα από το άλλο και διασκορπίζονται σε μοριακό επίπεδο μέσα στο περιβάλλον ενός ολιγοσακχαρίτη.

Γενικά, όσο μικρότερο είναι το ξενιζόμενο μόριο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα εγκλεισμού. Ο βαθμός δραστηριότητας για τα μεγαλύτερα μόρια εξαρτάται από την παρουσία μιας κατάλληλης ομάδας ή δακτυλίου ικανού να εισέλθει στον θύλακα (ένα ή δυο δακτυλίους βενζενίου ή ακόμη μεγαλύτερα που κουβαλούν ένα αρωματικό δακτύλιο, μια πλευρική αλυσίδα ή άλλες ομάδες συγκρίσιμο μεγέθους). Μόνο τα λιπόφιλα τμήματα αυτών των μορίων πρέπει να ταιριάζουν μες στην λιπόφιλη κοιλότητα της CD και όχι ολόκληρα τα μόρια (Guo et al., 2003).

Για ξενιζόμενα μόρια παρομοίων διαστάσεων, παρατηρείται τα πιο υδρόφοβα μόρια να έχουν τη μεγαλύτερη συγγένεια με την κοιλότητα των CDs σε υδατικό διάλυμα, αφού η κοιλότητα παρέχει ένα ετερογενές υδρόφοβο μικροπεριβάλλον.

Η μοριακή ενθυλάκωση από τις CDs συχνά μεταβάλλει προς την σωστή κατεύθυνση τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες των εγκλεισμένων μορίων όπως την υδατοδιαλυτότητα και την σταθερότητα. Είναι επίσης απλούστερη και φθηνότερη από οποιαδήποτε άλλη μέθοδο εγκλεισμού.

Μια ποικιλία αλληλεπιδράσεων εμφανίζεται κατά την διαδικασία του εγκλεισμού (Liu & Guo, 2002). Συνήθως, οι van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι οι κύριες κατευθυντήριες δυνάμεις εγκλεισμού (Driving Forces) για την συμπλοκοποίηση κυκλοδεξτρινών, ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζουν την διαμόρφωση συγκεκριμένων προϊόντων εγκλεισμού.

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της K_s πέρα από το διάγραμμα διαλυτότητας: ποτενσιομετρία, μικροθερμιδομετρία, NMR, κυκλικός διχρωσμός, UV-ορατού φασματοσκοπία, HPLC και TLC. Τα σύμπλοκα που παρουσιάζουν τιμές για την σταθερά K_s από 100 έως $5000M^{-1}$, είναι συνήθως κατάλληλα για πρακτικές εφαρμογές. Σε πολύ ασταθή σύμπλοκα παρατηρείται πρόωρη απελευθέρωση του ξενιζόμενου μορίου και σε πολύ σταθερά επιβραδυνόμενη ή ατελής απελευθέρωση και συνεπώς η απορρόφηση παρεμποδίζεται. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, ακόμη και με μικρές K_s τιμές, η συμπλοκοποίηση επιφέρει καλύτερες φυσικοχημικές, φαρμακευτικές και βιοφαρμακευτικές ιδιότητες για φάρμακα ή/και άλλα μόρια.

1.2.2. Εφαρμογές του εγκλεισμού

1.2.2.α. Εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών

Ο εγκλεισμός αποτελεί μια μέθοδο προστασίας των συστατικών των τροφίμων που είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία, την οξείδωση, την υγρασία, τους μικροοργανισμούς, κ.α. Η χρήση CDs σε τρόφιμα και ποτά έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, καθώς έχουν πλείστες εφαρμογές στην επεξεργασία τροφίμων και ως πρόσθετα τροφίμων. Αιθέρια έλαια και πτητικές ενώσεις (Bethanis et al., 2012) μπορεί να εγκλειστούν σε CDs προκειμένου να βελτιώσουν την υδατοδιαλυτότητα τους, να αποφύγουν την αποδόμηση από οξυγόνο, φως και θερμότητα και την απώλεια κατά την επεξεργασία και αποθήκευση, και να σταθεροποιήσουν αρώματα, γεύσεις και αιθέρια έλαια από ανεπιθύμητες αλλαγές. Επιπλέον, η χρήση προϊόντων εγκλεισμού γεύσεων σε

CDs επιτρέπει την χρήση τους σε πολύ μικρές ποσότητες. Αντίθετα, οι CDs μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την αφαίρεση οσμών ή απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών όπως μη-αρωματικών ή πικρών συστατικών που είναι παρόντα σε τρόφιμα και ποτά στην φυσική τους μορφή, ελαττώνοντας δυσάρεστες μυρωδιές και γεύσεις. Οι CDs μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν για να επιτευχθεί η ελεγχόμενη απελευθέρωση συγκεκριμένων συστατικών τροφίμων και ποτών. Τα συστατικά των τροφίμων απελευθερώνονται στον κατάλληλο τόπο και χρόνο με τον επιθυμητό ρυθμό με μια μεταβολή στην θερμοκρασία, υγρασία και pH.

1.2.2.β. Εφαρμογές σε άλλες βιομηχανίες

Λόγω της μεγάλης ικανότητας συμπλοκοποίησης και της αμελητέας τοξικότητά τους, οι CDs χρησιμοποιούνται ευρέως ως μεταφορείς φαρμάκων (Challa et al., 2005). Επιπροσθέτως, χρήσεις τους εντοπίζονται στις βιομηχανίες κοσμητικών, ειδών υγιεινής, αγροχημικών και προστασίας του περιβάλλοντος.

Πιο αναλυτικά, στη φαρμακευτική βιομηχανία, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για:

- μείωση πτητικότητας φαρμακευτικών ουσιών
- μετατροπή των υγρών ενώσεων σε κρυσταλλική μορφή
- κάλυψη δυσάρεστων οσμών ή γεύσεων κάποιων φαρμάκων
- αποφυγή ανεπιθύμητων ασυμβατοτήτων
- αύξηση βιοδιαθεσιμότητας και σταθερότητας ενός φαρμάκου παρουσία φωτός, αυξημένης θερμοκρασίας και παραγόντων οξειδωσης

Έτσι, ο χρόνος ζωής των φαρμάκων καθώς και οι οργανοληπτικές του ιδιότητες όπως η ευχάριστη γεύση των συστατικών σε συγκεκριμένη δόση, μπορεί να αυξηθούν. Αυτό μπορεί να παρακινήσει την εισαγωγή και την επανεξέταση ενός πλήθους δραστικών ουσιών που λόγω προβλημάτων σταθερότητας, ασυμβατότητας ή απορρόφησης δεν χρησιμοποιούνται σήμερα. Η αύξηση στην διαλυτότητα, διαλυματοποίηση, ρυθμό απελευθέρωσης και βιοδιαθεσιμότητα, η τροποποίηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, η τροποποίηση της διάθεσης των φαρμάκων, η επιμήκυνση της απελευθέρωσης των φαρμάκων και η στοχευόμενη θεραπεία μπορεί να επιτευχθούν μέσω των κυκλοδεξτρινών (Loftsson & Brewster, 2011).

Παράλληλα, οι CDs σχηματίζουν σύμπλοκα με μια μεγάλη ποικιλία αγροχημικών όπως φυτορρυθμιστικές ουσίες, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, εντομοαπωθητικά, μυκητοκτόνα και φερομόνες (Triantafylloroulou et al., 2012). Ο εγκλεισμός προσφέρει βραδεία αποδέσμευση οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρότερες ποσότητες των δραστικών ουσιών με μεγαλύτερη διάρκεια δράσης από τη στιγμή της εφαρμογής. Παράλληλα, ουσίες ελάχιστα διαλυτές στο νερό (η πλειονότητα των αγροχημικών), μπορούν να γίνουν πιο ευδιάλυτες, να υπάρξει ομοιογενής κατανομή σε μία μεγάλη επιφάνεια και να μεταφερθεί το μεγαλύτερο τμήμα τους στο εσωτερικό του κυττάρου (Szejtli, 1985).

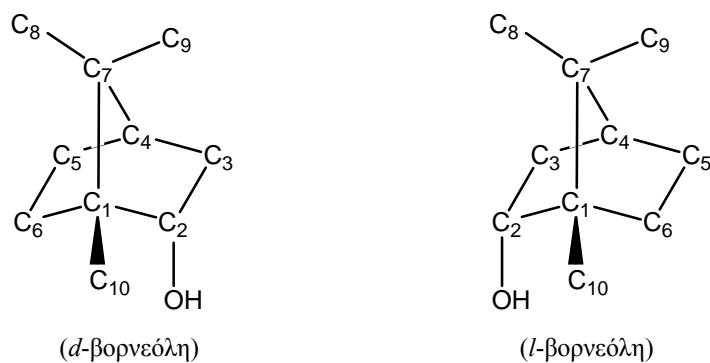
1.2.2.γ. Χρήση για διαχωρισμό ρακεμικού μίγματος

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι χειρόμορφοι υποδοχείς που προσδέονται σε μια πληθώρα υδρόφοβων χειρόμορφων μορίων και είναι γνωστές για την χρήση τους στην σταθερή φάση σε μελέτες με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας και της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές (capillary electrophoresis). Οι Voskuhl et al., (2011) μελέτησαν την αλληλεπίδραση τροποποιημένων διμερών β -CDs με τροποποιημένα μόρια βορνεόλης, μενθόλης και ισοπινokaμφεόλης στην (+) ή (-) διαμόρφωσή τους και διαπίστωσαν ότι τα διμερή εμφανίζουν σημαντική προτίμηση στο (+) εναντιομερές της βορνεόλης σε σχέση με το (-), εν αντιθέσει με τις μη τροποποιημένες β -CD, όπου δεν υπάρχει εμφανής προτίμηση στον εγκλεισμό.

Η εισαγωγή στην β -CD ενός αρωματικού δακτυλίου που περιέχει διαφορετικές υποκατεστημένες ομάδες προσφέρει αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης των κυκλοδεξτρινών σε μόρια-προσδέτες και ενισχύει τον ρακεμικό διαχωρισμό. Οι Liu et al., (2007) χρησιμοποίησαν μια σειρά τεχνικών για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων τροποποιημένων β -CDs με εναντιομερή βορνεόλης

1.2.3. Βορνεόλη

Τα μονοτερπένια είναι κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων πολλών φυτών (Chen et al., 2005). Η (+)-βορνεόλη (ενδο-(1R)-1,7,7-τριμέθυλοδίκυκλο [2.2.1] επταν-2-όλη, κατά IUPAC) ή *d*-βορνεόλη και το εναντιομερές της (-)-βορνεόλη (ενδο-(1S)-1,7,7-τριμέθυλοδίκυκλο [2.2.1] επταν-2-όλη, κατά IUPAC) ή *l*-βορνεόλη είναι δικυκλικά μονοτερπένια με πενταμελή τον δεύτερο δακτύλιο, που ανήκουν στην ίδια κατηγορία μονοτερπενίων με την καμφορά, ενώ παρουσιάζουν και παρόμοια βιολογική δράση με αυτήν (Σχήμα 1.7.). Η βορνεόλη είναι μια πτητική χειρόμορφη αλκοόλη, η δράση της οποίας ως αναισθητική και αναλγητική ουσία την έκανε μια δημοφιλή στην παραδοσιακή ιατρική της Κίνας και της Ιαπωνίας (Granger et al., 2005). Η βορνεόλη, η ισοβορνεόλη (διαστεreoμερές) και η καμφορά παράγονται από το α -πινένιο, που χρησιμοποιείται για παραγωγή σχεδόν όλης της σειράς των μονοτερπενίων, που χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία. Στην πράξη χρησιμοποιείται μίγμα από *d,l*-βορνεόλης και ισοβορνεόλης ή κυρίως *d*-βορνεόλη με καθαρότητα >95%. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως το μίγμα αποδομείται κατά την αποθήκευση σε τοξικά παράγωγα της καμφοράς που μπορεί να φτάνουν το 45% με 97%, ενώ η *d*-βορνεόλη είναι σταθερή και μη τοξική κι έτσι προτιμάται αντί του μίγματος σε φάρμακα και πρόσθετα τροφίμων.



Σχήμα 1.7. Οι εναντιομερείς μορφές (*d*) και (*l*) του μορίου της βορνεόλης

Αναγωγή της καμφοράς οδηγεί στις δύο ισομερείς αλκοόλες (βορνεόλη και ισοβορνεόλη) σε ποσοστό που ποικίλει ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο. Αντιδραστήρια, όπως τα υδρίδια λιθίου και αργιλίου ή η καταλυτική υδρογόνωση

ευνοούν την ισοβορνεόλη, ενώ η ηλεκτρολυτική αναγωγή ευνοεί τη βορνεόλη. Οι παράγοντες που συνήθως χρησιμοποιούνται για την αναγωγή είναι υδρίδια μετάλλων, όπως LiAlH_4 (υδρίδιο του λιθίου του αλουμινίου) και NaBH_4 (βοροϋδρίδιο του νατρίου).

Τα προϊόντα διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο τα υδρίδια των μετάλλων μεταφέρουν ένα πρωτόνιο στην επίπεδη καρβονυλική ομάδα. Στερεοχημικές απαιτήσεις του υποστρώματος, της καμφοράς, μπορεί να κατευθύνουν την προσθήκη του πρωτονίου σε μια από τις δυο πλευρές του καρβονυλίου. Προσθήκη πρωτονίου στην έξω- πλευρά της καμφοράς σχηματίζει βορνεόλη (το ένδο- προϊόν). Προσθήκη πρωτονίου στην ένδο- πλευρά της καμφοράς σχηματίζει ισοβορνεόλη, το (έξω- προϊόν). Όταν σχηματίζεται περισσότερη ποσότητα από το ένα προϊόν, η αντίδραση λέγεται στερεοεκλεκτική. Μόλις τα προϊόντα απομονωθούν και αναγνωριστούν, μπορούμε να εξετάσουμε το εάν η αναγωγή είναι στερεοεξειδικευμένη μετρώντας την οπτική στροφή των αντιδρώντων και των προϊόντων της αντίδρασης. Αν η αντίδραση είναι στερεοεξειδικευμένη, οπτικές καθαρή (+)- ή (-)-καμφορά θα δίνει μόνο (+)- ή (-)-βορνεόλη είτε μόνο (+)- ή (-)-Ισοβορνεόλη, χωρίς απώλειες στην οπτική καθαρότητα. Στην περίπτωση όμως παραλαβής ρακεμικού μίγματος με εκχύλιση από φυτά, ο διαχωρισμός ενός τέτοιου μίγματος (*d,l*)-βορνεόλης ή (*d,l*)-ισοβορνεόλης παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον.

1.2.3.α. Φυτικοχημικές ιδιότητες της βορνεόλης

Οι φυτικοχημικές ιδιότητες της βορνεόλης φαίνονται στον πίνακα 1.1. Η βορνεόλη και η ισοβορνεόλη απαντώνται ως συστατικά αιθερίων ελαίων ενός πλήθους φυτών, που έχουν αποδεδειγμένη φαρμακευτική δράση όπως *Valeriana officinalis* L. και *Dryovalanops aromatica*. Ειδικά η *l*-βορνεόλη, συναντάται στα αιθέρια έλαια φυτών *Abies concolor*, *Pinus palustris*, φυτών γένους *Thuja* L., *Coriandum sativum* και *Lippia adoensis* (Opdyke, 1975). Χρησιμοποιείται από το 1920 στην αρωματοποιία στις Η.Π.Α. σε ποσότητες 2000lb/yr. Χαρακτηρίστηκε ως προϊόν GRAS από την FEMA το 1965, εγκρίθηκε από την FDA για χρήση σε φαγητά και περιελήφθη από το συμβούλιο της Ευρώπης (1974) σε επίπεδα 5ppm στην λίστα των τεχνητών αρωματικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων χωρίς να απειλούν την δημόσια υγεία.

Πίνακας 1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της βορνεόλης

Μοριακός τύπος	$C_{10}H_{18}O$
Περιγραφή	Λευκή κρυσταλλική σκόνη
Μοριακό βάρος	154.25
Σημείο τήξεως	205-210° C
Πυκνότητα	0,8648 g /cm ³ (20° C)
Διαλυτότητα στο νερό	Αδιάλυτο
Άγνωστοι κίνδυνοι	Ευκολία στην ανάφλεξη, παραγωγή τοξικών αερίων
Προστασία στη χρήση	Γάντια και αποφυγή άμεσης επαφής
Τοξικότητα	Τοξικό για δέρμα, μάτια και κατάποση. Ντελίριο, ερεθισμοί κ.α.

Μερικά βιολογικά στοιχεία για την βορνεόλη δίνονται παρακάτω (Opdyke, 1975):

Όσον αφορά την τοξικότητα θανατηφόρος δόση σε πειραματόζωα είναι μερικά g/Kg. Η βορνεόλη έχει αναφερθεί πως προκαλεί ναυτία, εμετό, διανοητική σύγχυση, ζαλάδα και σπασμούς στον άνθρωπο. Δεν προκαλεί γενικά ερεθισμό, ούτε ευαισθησία, σε συγκέντρωση 8% σε σκευάσματα βαζελίνης. Η βορνεόλη φαίνεται να μεταβολίζεται και απεκκρίνεται ολόκληρη ή ως γλυκουρονίδιο. Φαρμακολογικά, προκαλεί εξαρτώμενη από την δόση μείωση των εκκρίσεων της χολής.

1.2.3. β. Χρήσεις βορνεόλης

Η βορνεόλη, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που περιγράφηκαν παραπάνω, αποτελεί μια από τις πολυτιμότερες ενώσεις τόσο στην βιομηχανία τροφίμων, όπου απαντάται ως κύριο συστατικό αρωματικών καρυκευμάτων όσο και την βιομηχανία φαρμάκων και στην πρακτική παραϊατρική της Κίνας και Ινδίας. Χρησιμοποιείται επίσης στην αρωματοθεραπεία και ως προσθετικό τροφίμων και κοσμητικών προϊόντων, όπως γλυκισμάτων, ποτών, οδοντόπαστων, αρωμάτων και προϊόντων περιποίησης δέρματος. Οι εφαρμογές περιλαμβάνουν θεραπείες γαστρικών πόνων, ιδίως του στομαχόπνου, τραυματισμών, εγκαυμάτων, ρευματοπαθειών και πληγών. Η βορνεόλη έχει παρόμοια με την καμφορά δράση ως προς την αντιμετώπιση νευραλγιών και πόνων από ρευματισμούς. Οι εστέρες των αλκοολών των βορνεολών είναι έλαια, ευκόλως διαλυτά

σε αλκοόλες και άλλα έλαια (ελαιόλαδο), ενώ παράλληλα αναδύουν και ευχάριστη ευωδία. Στην παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιείται για θεραπεία από κοιλιακό άλγος (κυρίως, στομαχόπονο), ενώ παράλληλα εμφανίζει αντιθρομβώδη και αντιαιμοπεταλιακή δράση (Kumar et al., 2011). Άλλες μελέτες αναδεικνύουν τη βορνεόλη ως τον κατάλληλο παράγοντα για την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας ορισμένων στοματικών φαρμάκων. Πιο ειδικά, η ουσία έχει χρησιμοποιηθεί ως μεταφορέας φαρμάκου, αφού η χαμηλή φαρμακολογική του δράση το καθιστά ικανό να εισέρχεται στον εγκέφαλο μεταφέροντας το φάρμακο σε συγκεκριμένο στόχο, αυξάνοντας την θεραπευτική ικανότητα του τελευταίου (He et al., 2011). Αυτές οι επιδράσεις αποδίδονται στην ικανότητα της ουσίας να ρυθμίζει θετικά τους GABA_A αναστολείς των νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις των νευρικών κυττάρων (Granger et al., 2005).

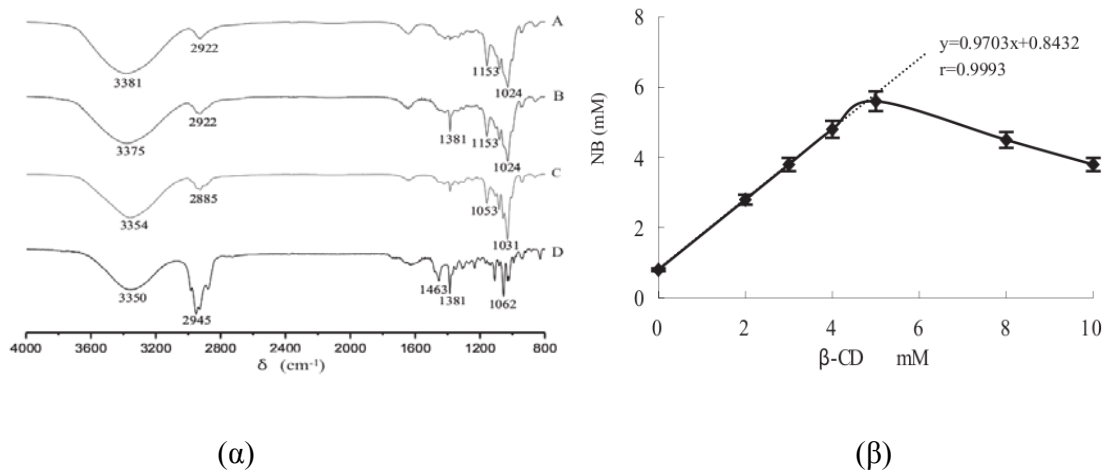
Πρόσφατα, πολλοί ερευνητές έδειξαν πως η *d*-βορνεόλη μπορεί να δράσει και ως διεισδυτικός παράγοντας εμπλουτισμού. Οι Wu et al., αναφέρουν πως η *d*-βορνεόλη ενισχύσει την απορρόφηση της ινσουλίνης από τον βλεννογόνο του στόματος και επιταχύνει την απορρόφηση των ουσιών (puerarin και timolol maleate) σε σταγόνες μέσω του κερατοειδούς χιτώνα *in vitro* (Wu et al., 2006).

Λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων καθώς και της μεγάλης ικανότητας διείσδυσης, η *d*-βορνεόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε φάρμακα και λειτουργικά τρόφιμα. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της αστάθειας κατά την διαδικασία προετοιμασίας και αποθήκευσης, λόγω της εύκολης εξάχνωσής της και της χαμηλής διαλυτότητας στο νερό περιορίζουν την χρήση της. Προκειμένου να βελτιωθεί η διαλυτότητα των βιοπροϊόντων, αρκετές τεχνικές όπως η διασπορά της στερεάς κατάστασης και ο σχηματισμός προϊόντων εγκλεισμού έχουν αναπτυχθεί. Ανάμεσα σε αυτές τις τεχνικές η συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες και παράγωγά τους έχει αποδειχθεί πως είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος αύξησης της διαλυτότητας στο νερό.

1.2.3.γ. Σχηματισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος εγκλεισμού βορνεόλης σε β -CD

Το σύμπλοκο της *d*-βορνεόλης με β -CD έχει χαρακτηριστεί με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως FT-IR, XRD, DSC. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η *d*-Βορνεόλη μπορεί να σχηματίσει προϊόν εγκλεισμού με την β -CD με την χρήση υπερήχων και σε μοριακή αναλογία (β -CD : βορνεόλη) 1 : 1. Το σύμπλοκο εμφανίζει διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες διαφορετικές από εκείνες της ελεύθερης μορφής του μορίου. Ο σχηματισμός του προϊόντος εγκλεισμού σε β -CD αυξάνει σημαντικά την σταθερότητα και την υδατοδιαλυτότητα της βορνεόλης.

Τα IR φάσματα των *d*-βορνεόλης, β -CD, του φυσικού μίγματος και του προϊόντος εγκλεισμού *d*-βορνεόλης/ β -CD εμφανίζονται στο σχήμα 1.8.α (Su et al., 2012). Το φάσμα του μίγματος (B) παρουσιάζει ομοιότητα με καθένα από εκείνα της β -CD και της *d*-βορνεόλης ξεχωριστά. Ωστόσο, το φάσμα του προϊόντος εγκλεισμού δεν εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά με εκείνο της *d*-βορνεόλης (C). Οι αλλαγές στις απορροφήσεις μπορεί να οφείλονται στον σχηματισμό ενδομοριακών Η-δεσμών μεταξύ της *d*-βορνεόλης και της β -CD (Σχήμα 1.8.α).



Σχήμα 1.8.α. FT-IR ανάλυση και **β.** διάγραμμα διαλυτότητας συμπλόκου *d*-βορνεόλης / β -CD. Πηγή: (Su et al., 2012)

Η στοιχειομετρία του συμπλόκου καθορίστηκε με μελέτη της μεταβολής της διαλυτότητας της βορνεόλης παρουσία κυκλοδεξτρίνης. Το προφίλ του διαγράμματος διαλυτότητας εμφανίζεται στο σχήμα 1.8β. και μπορεί να ταξινομηθεί ως κλάσης B_s σύμφωνα με την τεχνική Higuchi-Connors. Η διαλυτότητα της *d*-βορνεόλης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της β -CD σε ένα εύρος από 0 έως 5mM. Για συγκέντρωση β -CD μεγαλύτερη από 5mM, η διαλυτότητα της *d*-βορνεόλης μειώνεται. Σύμφωνα με την θεωρία των Higuchi-Connors, η 1:1 αναλογία του προϊόντος εγκλεισμού επιτυγχάνεται στο αρχικό ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης με κλίση 0.9703. Η σταθερά $K_{1:1}$ υπολογίζεται στα 38812 M⁻¹ σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, η οποία υποδηλώνει πολύ ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ *d*-βορνεόλης και β -CD.

Κεφάλαιο 2^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-X

2.1. Κρυσταλλογραφία

Η κρυσταλλογραφία είναι μέθοδος προσδιορισμού των σχετικών θέσεων των ατόμων μορίων στο χώρο και βασίζεται στη σκέδαση ακτινοβολίας-X από κρυστάλλους, που χαρακτηρίζονται από την περιοδική διάταξη των δομικών τους λίθων κατά τις τρεις διαστάσεις. Η κρυσταλλική δομή αποτελείται από μία περιοδικά επαναλαμβανόμενη βασική δομική μονάδα, την μοναδιαία κυψελίδα, που επεκτείνεται προς τις τρεις διαστάσεις (McPherson, 2009). Η τελευταία μπορεί να περιλαμβάνει:

1. ένα ή περισσότερα μόρια
2. ένα ή περισσότερα μόρια και ένα ή περισσότερα μόρια προσδέτη και διαλύτη

Επομένως, μελετώντας την ασύμμετρη μονάδα (μικρότερο δυνατό τμήμα της δομής που δεν επαναλαμβάνεται με καμία πράξη συμμετρίας στον χώρο) της κυψελίδας και προσδιορίζοντας τις θέσεις των ατόμων της, έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα του κρυστάλλου.

Κάθε κρυσταλλογραφική μελέτη περιέχει τα εξής στάδια-βήματα: i) κρυστάλλωση, ii) συλλογή δεδομένων περίθλασης, iii) επεξεργασία δεδομένων περίθλασης και iv) καθορισμός της υπό εξέταση δομής, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

2.1.1. Κρυστάλλωση

Υπάρχουν πολλοί μέθοδοι κρυστάλλωσης βιομορίων, αλλά όλες στοχεύουν στο να φτάσει το διάλυμά τους σε μια κατάσταση υπερκορεσμού. Οι βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών αυτές της διάχυσης ατμών, διαπήδησης (dialysis), της άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης (batch) και διάχυσης μέσω διεπαφής. Παράλληλα, κρυστάλλωση μικρών ή μεσαίων σε μέγεθος βιομορίων (π.χ. υπερμοριακά σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών) μπορεί να επιτευχθεί και μέσω βαθμιαίας ψύξης αντίστοιχου διαλύματος.

2.1.1.α. Πρωτεϊνική κρυστάλλωση

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την πυρήνωση και κρυσταλλική ανάπτυξη βιολογικών μακρομορίων. Η κρυσταλλική ανάπτυξη και η πυρήνωση επηρεάζονται με την σειρά τους από την χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Έτσι, θα πρέπει να δοκιμάζονται διαφορετικές μέθοδοι προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Καθώς η διαλυτότητα εξαρτάται από την θερμοκρασία (μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί ανάλογα με την πρωτεΐνη), τα πειράματα συνίσταται να εκτελούνται υπό σταθερή θερμοκρασία, σε θερμορυθμιζόμενους θαλάμους.

Ένας καθοριστικός παράγοντας που ρυθμίζει την κρυστάλλωση είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως κατακρημνιστές. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για ουσίες (π.χ. PEG, αλάτια, κ.α.) που προστίθενται στο πρωτεϊνικό διάλυμα με σκοπό να αποδυναμώσουν τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τα μόρια νερού που την περιβάλλουν και ευνοούν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του κατακρημνιστή είναι η κύρια παράμετρος που εξετάζεται σε πειράματα κρυστάλλωσης.

Τα πειράματα κρυστάλλωσης βασίζονται, κυρίως, στις παρατηρήσεις που προκύπτουν από την μελέτη της διαλυτότητας της πρωτεΐνης.

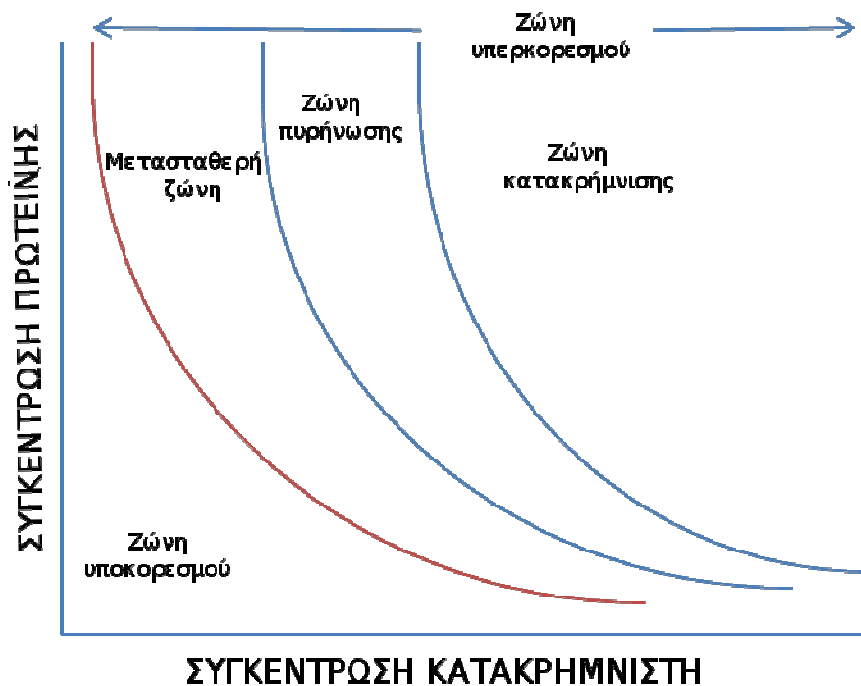
Η διαδικασία αυτή πολλές φορές δεν είναι επιτυχής. Αλλάζοντας τις συνθήκες του διαλύματος μπορεί: 1) να παραμείνει η πρωτεΐνη διαλυτή, 2) να εμφανιστούν συσσωματώματα ή 3) να σχηματιστεί κρύσταλλος, όχι κατάλληλος για επίλυση δομής λόγω της πτωχής εικόνας περίθλασης που παράγεται όταν ακτινοβολείται με ακτίνες-X.

Συχνά τα προβλήματα αντιμετωπίζονται εμπειρικά (trial and error). Ωστόσο, τα συμπεράσματα από μια τέτοια διαδικασία δεν μπορεί να γενικευτούν. Οι βέλτιστες συνθήκες κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης, δεν είναι απαραίτητα οι βέλτιστες και για μια άλλη.

Ένα σημαντικό εργαλείο στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι το διάγραμμα διαλυτότητας που δείχνει την κατάσταση διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης σαν συνάρτηση όλων των σχετικών μεταβλητών στο σύστημα. Για ένα πρωτεϊνικό διάλυμα, αυτές οι μεταβλητές είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία και τα χαρακτηριστικά του διαλύτη (π.χ. pH, ιοντική ισχύς, συγκέντρωση και είδος του ρυθμιστικού διαλύματος

και πρόσθετων χημικών). Η πιο κοινή μορφή ενός τέτοιου διαγράμματος πρωτεϊνών είναι δισδιάστατη και συνήθως εμφανίζει την διαλυτότητα της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και μιας άλλης παραμέτρου, με όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους να είναι σταθερές (Asherie, 2004).

Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης μεταβάλλεται με τις συνθήκες του διαλύματος. Στο σχήμα 2.1. δίνεται διάγραμμα της καμπύλης διαλυτότητας, που δείχνει πως μεταβάλλεται η διαλυτότητα με την συγκέντρωση του κατακρημνιστή και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Οι τρεις περιοχές της ζώνης υπερκορεσμού (μετασταθερή, πυρήνωσης και κατακρήμνισης) φαίνονται στο σχήμα. Οι κρύσταλλοι λύονται στην περιοχή υποκορεσμού (όπου η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι χαμηλότερη από την διαλυτότητα) και αναπτύσσονται στην περιοχή υπερκορεσμού. Γενικά, κρύσταλλοι σχηματίζονται σε πρωτεϊνικό διάλυμα που είναι σε υπερκορεσμό π.χ. όταν η πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερβεί την διαλυτότητα. Ο μεγάλος υπερκορεσμός απαιτείται για να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα για τον σχηματισμό του κρυστάλλου. Αυτό το φράγμα αντιστοιχεί στην ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για την κατασκευή μιας μικροσκοπικής ομάδας πρωτεϊνών (γνωστής και ως πυρήνας) από την οποία θα μεγαλώσει τελικά ο κρύσταλλος. Η ύπαρξη του ενεργειακού φράγματος έχει ως αποτέλεσμα η πυρήνωση (διαδικασία σχηματισμού πυρήνα) να είναι χρονοβόρα. Αν ο υπερκορεσμός είναι πολύ μικρός, ο ρυθμός πυρήνωσης θα είναι τόσο αργός ώστε κανένας κρύσταλλος δεν θα σχηματιστεί μετά από ένα εύλογο χρονικό διάστημα. Η αντίστοιχη περιοχή στο διάγραμμα φάσης λέγεται «μετασταθερή ζώνη». Στην «ασταθή» ή «ζώνη πυρήνωσης», ο υπερκορεσμός είναι αρκετά μεγάλος ώστε να παρατηρηθεί αυθόρμητη πυρήνωση. Αν ο υπερκορεσμός είναι πολύ μεγάλος, μπορεί να σχηματιστούν ακανόνιστες μορφές δομών όπως συσσωματώματα ή ιζήματα. Η ζώνη κατακρήμνισης δεν ευνοεί τον σχηματισμό των κρυστάλλων, διότι τα συσσωματώματα και ιζήματα σχηματίζονται ταχύτερα από τους κρυστάλλους (Σχήμα 2.1.). Οι ζώνες αυτές σχετίζονται με κινητικά φαινόμενα και τα όρια μεταξύ τους δεν είναι σαφώς ορισμένα. Αντίθετα η καμπύλη διαλυτότητας διαχωρίζει σαφώς την κρυσταλλική κατάσταση από το διάλυμα. Αν και η διάκριση σε ζώνες είναι καθαρά ποιοτική, η παρατήρηση των διαφορετικών συμπεριφορών με την μεταβολή των πειραματικών παραμέτρων μπορεί να οδηγήσει στην αναζήτηση των κατάλληλων συνθηκών για την δημιουργία κρυστάλλων.



Σχήμα 2.1. Τυπική καμπύλη διαλυτότητας πρωτεΐνης

Στο σημείο αυτό θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην κρυστάλλωση με μεθόδους διάχυσης ατμών, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η βασική αρχή της μεθόδου κρυστάλλωσης που φαίνεται στο σχήμα 2.2.α. είναι κατάλληλη για μικρούς όγκους (κάτω από 5μL). Μια σταγόνα που περιέχει την προς κρυστάλλωση ουσία μαζί με το ρυθμιστικό της διάλυμα, τον παράγοντα κρυστάλλωσης και τα πρόσθετα χημικά, εξισορροπείται έναντι μιας μικρής δεξαμενής που περιέχει διάλυμα του παράγοντα κρυστάλλωσης σε υψηλότερη συγκέντρωση από την σταγόνα. Η διαδικασία εξισορρόπησης μέσω διάχυσης των πτητικών συστατικών (νερό ή οργανικός διαλύτης) συνεχίζεται μέχρι η πίεση ατμών στην σταγόνα φτάσει την τιμή εκείνης της δεξαμενής. Αν η εξισορρόπηση επιτυγχάνεται με ανταλλαγή υδρατμών (από την σταγόνα στη δεξαμενή), οδηγούμαστε σε μια αλλαγή του όγκου της σταγόνας. Επομένως, η συγκέντρωση όλων των συστατικών στην σταγόνα θα αλλάξει. Για συστατικά με πίεση ατμών υψηλότερη από το νερό, η ανταλλαγή γίνεται με κατεύθυνση από τη δεξαμενή στην σταγόνα. Η ίδια αρχή ισχύει για τις τεχνικές της κρεμάμενης, της καθήμενης και του τύπου σάντουιτς σταγόνας.

Για την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας χρησιμοποιούνται πιάτα δοκιμασιών (crystallization plates) (σχήμα 2.2.β), που διατίθενται στο εμπόριο και περιέχουν αριθμημένα «πηγάδια». Καθένα από αυτά έχει όγκο περίπου 2 ml και εσωτερική διάμετρο 16mm. Υπάρχει ένα μικρό χείλος στην άκρη κάθε «πηγαδιού», προκειμένου να σφραγιστεί το σύστημα. Κάθε πηγάδι καλύπτεται με μια γυάλινη καλυπτρίδα διαμέτρου 22 mm, στα άκρα της οποίας τοποθετείται σιλικόνη για αεροστεγές σφράγισμα (Σχήμα 2.2.α.).



Σχήμα 2.2.α. Η αρχή της μεθόδου της κρυστάλλωσης μέσω διάχυσης ατμών με την τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, **β.** Εμπορικά πιάτα δοκιμασιών

Χρησιμοποιώντας πιάτα Linbro, οι Mikol et al., (1990) μελέτησαν το ρυθμό εξάτμισης του νερού από κρεμάμενη σταγόνα με θειϊκό αμμώνιο, PEG και MPD. Η κινητική της εξάτμισης του νερού θα καθορίσει την κινητική του υπερκορεσμού και επομένως τον ρυθμό πυρήνωσης. Οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν τον ρυθμό της εξάτμισης του νερού είναι η θερμοκρασία, ο αρχικός όγκος σταγόνας (και η αρχική αναλογία επιφάνειας προς όγκο στη σταγόνα), η πίεση υδρατμών του πηγαδιού και η χημική φύση του παράγοντα κρυστάλλωσης. Η απόσταση της σταγόνας από τη δεξαμενή και η παρουσία βιολογικών μακρομορίων δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον ρυθμό εξάτμισης του νερού. Ταχύτερη εξισορρόπηση συμβαίνει παρουσία θειικού αμμωνίου, βραδύτερη παρουσία MPD και ακόμη βραδύτερη παρουσία PEG. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά του PEG πιθανώς να εξηγεί την χρησιμότητά του ως παράγοντα κατακρήμνισης σε κρυσταλλώσεις. Η κρυσταλλική ανάπτυξη ευνοείται όταν ο

υπερκορεσμός επιτυγχάνεται πολύ αργά. Αυτό το δεδομένο επιβεβαιώνεται με ανεξάρτητα πειράματα στα οποία ο τελικός όγκος του κρυστάλλου αυξήθηκε σημαντικά με μείωση της πίεσης ατμών του πηγαδιού σαν συνάρτηση με το χρόνο.

2.1.1.β. Κρυστάλλωση με την Μέθοδο Αργής Ψύξης

Οι κρύσταλλοι οργανικών ενώσεων μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους είναι πολύ διαφορετικοί από τους πρωτεϊνικούς. Δημιουργούνται κι αυτοί αργά, απαιτούν ημέρες, αλλά είναι συνήθως λιγότερο εύθραυστοι και ευαίσθητοι στις μηχανικές καταπονήσεις. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να δημιουργηθούν, αλλά η βασική ιδέα είναι και εδώ η βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας πέρα από το όριο διαλυτότητας. Η κρυστάλλωση είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στις μεταβολές του pH, στις δονήσεις και τους διαλύτες (π.χ. ιόντα, κα). Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών συνθηκών εξετάζεται συστηματικά, για να βρεθούν εκείνες στις οποίες οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται ικανοποιητικά. Μόλις σχηματιστεί ένας κατάλληλος σε μέγεθος κρύσταλλος ελέγχεται για άλλες ιδιότητες, π.χ. την ικανότητα σκέδασης, κλπ.

Στην παρούσα εργασία η κρυστάλλωση συμπλόκων φυσικών κυκλοδεξτρινών έγινε με την μέθοδο της αργής ψύξης. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την δημιουργία και την ανάπτυξη κρυστάλλων των προϊόντων εγκλεισμού σε CDs είναι η ακόλουθη:

Σε υδατικό διάλυμα προστίθενται ποσότητες κυκλοδεξτρίνης και της ουσίας που πρόκειται να εγκλειστεί σε αυτή στη συνήθη αναλογία (CD:ξενιζόμενο μόριο) 1:1, χωρίς η συγκεκριμένη αναλογία να είναι πάντα η ενδεδειγμένη για την δημιουργία του συμπλόκου. Για την δημιουργία κεκορεσμένου διαλύματος απαιτούνται συνήθως 30 mg α - ή β -CD σε 1 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα που περιέχει την CD και την προς εγκλεισμό ουσία, αναδεύεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο, όπου πραγματοποιείται βαθμιαία ψύξη του δείγματος. Η αρχική θερμοκρασία των 70°C, που σταδιακά μειώνεται μέχρι την θερμοκρασία των 25°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος) περίπου. Η μείωση της θερμοκρασίας πρέπει να είναι σταδιακή και αργή, ειδικά τις τελευταίες μέρες του πειράματος της κρυστάλλωσης. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να διαρκέσει 7-

15 ημέρες περίπου και η ελάττωση της θερμοκρασίας γίνεται 2 ή 3 φορές την ημέρα και είναι της τάξης των 3-4°C τις πρώτες ημέρες του πειράματος, ενώ αργότερα η μείωση πρέπει να είναι της τάξης των 1 έως 2°C. Όταν πραγματοποιηθεί η βαθμιαία ψύξη των διαλυμάτων, τα δείγματα τοποθετούνται για μια ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C, με σκοπό να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των κρυστάλλων και να διατηρηθούν χωρίς αλλοιώσεις.

2.1.2. Συλλογή δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X

2.1.2.α. Ακτίνες-X – Οργανολογία

Οι ακτίνες-X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος από 0,02 έως 100Å και παρέχουν τη δυνατότητα προσδιορισμού των ατομικών θέσεων σε κρυσταλλικές δομές, αφού τα μήκη κύματος των ακτίνων-X έχουν παρόμοια τιμή με το μέγεθος των ατόμων. Η ενέργεια των ακτίνων-X είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματός τους βάσει της εξίσωσης: $E=hn=hc/\lambda$,

όπου E είναι η ενεργεια της ακτινοβολίας, h η σταθερά του Planck, c η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος. Η ακτινοβολία X έχει υψηλότερη ενέργεια από τις ακτινοβολίες του ορατού φάσματος (400-700nm), ιδιότητα που την κάνει διεισδυτική σε υλικά σώματα αναλόγως της πυκνότητάς τους.

Τα όργανα μέτρησης στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι:

Εργαστηριακό περιθλασίμετρο (In-house source)

Σε ένα τέτοιο όργανο η ακτινοβολία-X παράγεται από ακίνητη ή περιστρεφόμενη άνοδο χαλκού ή μολυβδαινίου με τον εξής τρόπο: Αρχικά, ηλεκτρόνια παραγόμενα από θερμαινόμενη κάθοδο, επιταχύνονται σε υψηλή τάση και υπό κενό (seal tubes) και προσπίπτουν στην άνοδο με μεγάλη ταχύτητα. Έτσι, υπόκεινται σε απότομη μεταβολή της κινητικής τους κατάστασης. Η ταχεία μεταβολή της κινητικής κατάστασης των ηλεκτρονίων παράγει φωτόνια. Η είσοδος ταχέων ηλεκτρονίων στο θετικά φορτισμένο μεταλλικό πλέγμα της ανόδου, έχει ως αποτέλεσμα τη σύγκρουσή τους με τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στιβάδων των ατόμων (Cu ή Mo) του μεταλλικού πλέγματος, τα οποία εκτοπίζονται από τις εξωτερικές στιβάδες και μεταπίπτουν σε χαμηλότερες ενεργειακά στιβάδες. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε παραγωγή ακτινοβολίας-X.

Ένα τυπικό περιθλασίμετρο αποτελείται από μια πηγή ακτινοβολίας, ένα μονοχρωμάτορα για επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος, σχισμές που καθορίζουν το σχήμα της ακτίνας, μια γωνιομετρική κεφαλή (για ρύθμιση προσανατολισμού του δείγματος και των θέσεων του ανιχνευτή) και έναν ανιχνευτή. Όταν χρησιμοποιείται ανιχνευτής θέσης για την παρατήρηση της περιθλώμενης ακτινοβολίας, συνήθως είναι απαραίτητη και η χρήση μιας παγίδας (beamstop), προκειμένου να μειώσει την ένταση της αρχικής ακτινοβολίας, που δεν έχει περιθλαθεί από το δείγμα (σχήμα 2.3.α).

Ακτινοβολία σύγχροτρον (Synchrotron radiation)

Ένας άλλος τρόπος παραγωγής ακτίνων-X που αναπτύχθηκε και εφαρμόζεται ευρέως όταν απαιτείται υψηλή διακριτότητα στη δομική μελέτη είναι η ακτινοβολία σύγχροτρον. Στο σύγχροτρο, η ακτινοβολία παράγεται πάλι λόγω μεταβολής της κινητικής ενέργειας επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων, αφού τους προσφέρεται γραμμική αλλά και γωνιακή επιτάχυνση (εξαναγκάζονται να ακολουθούν κυκλική τροχιά). Η ακτινοβολία συγχρότρον έχει εξαιρετικά μεγάλη ένταση και μήκος κύματος που μπορεί να επιλεγεί κατά βούληση.

Το σύγχροτρο είναι ουσιαστικά ένας συγκεκριμένος τύπος κυκλικού ατομικού επιταχυντή στον οποίο το μαγνητικό πεδίο (που περιστρέφει τα σωματίδια) και το ηλεκτρικό πεδίο (που επιταχύνει τα σωματίδια) συγχρονίζονται προσεκτικά με τα κινούμενα σωματίδια. Αυξάνοντας κατάλληλα τις παραμέτρους των πεδίων, και καθώς τα σωματίδια κερδίζουν ενέργεια κι επιταχύνονται, η πορεία τους μπορεί να διατηρηθεί σταθερή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα μεγάλο κυκλικό μονοπάτι (προς αυτήν την κατεύθυνση βοηθά η χρήση καμπτόνων μαγνητών στα κυρτά τμήματα της διαδρομής καθώς και η ύπαρξη ευθυγράμμων τμημάτων ανάμεσα στους κάμποντες μαγνήτες) για τα επιταχυνόμενα σωματίδια. Καθώς τα σωματίδια εκτρέπονται λόγω των μαγνητικών πεδίων, παράγουν μια έντονη ακτινοβολία. Αυτή η ακτινοβολία κατευθύνεται μέσω εξειδικευμένων οδηγών (beamlines) στους πειραματικούς σταθμούς (workstations), όπου και χρησιμοποιούνται για έρευνητικούς σκοπούς (σχήμα 2.3.β). Στην περίπτωση της κρυσταλλογραφίας, αυτή η παραγόμενη ακτινοβολία πέφτει πάνω στον κρύσταλλο.

Η συλλογή των πειραματικών κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας τόσο με χρήση περιστρεφόμενης ανόδου Cu όσο και με ακτινοβολία σύγχροτρον.



(α)



(β)

Σχήμα 2.3.α. Περιθλασίμετρο με ανιχνευτή RaxisIV, όμοιο με εκείνο του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του Ε.Κ.ΕΦ.Ε. «Δημόκριτος» και **β.** Οι εγκαταστάσεις ακτινοβολίας σύγχροτρον στο EMBL (Αμβούργο, Γερμανία)

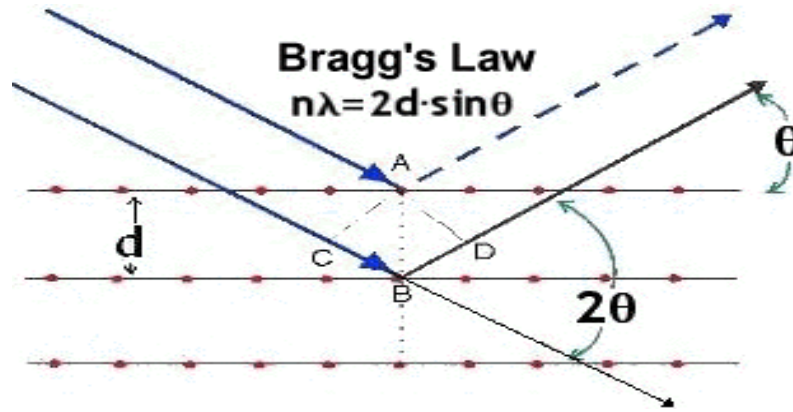
2.1.2.β. Γεωμετρία της περίθλασης-Νόμος Bragg

Όταν ακτινοβολία X προσπέσει σε ένα άτομο, μόριο ή ιόν, υφίσταται σκέδαση και επανεκπέμπεται σαν σφαιρικό κύμα. Η σκέδαση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση των ακτίνων- X με τα δεσμευμένα ηλεκτρόνια στα άτομα, μόρια ή ιόντα. Όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία διατηρεί το μήκος κύματός της λέμε ότι έχουμε ελαστική σκέδαση ή σκέδαση Thomson. Αντίθετα, αν μέρος της ενέργειας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται από τα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται το μήκος κύματος μετά την σκέδαση έχουμε ανελαστική σκέδαση ή σκέδαση Compton. Η μελέτη του φαινομένου περίθλασης ακτίνων- X από μονοκρυστάλλους στηρίζεται, αρχικά, στην παρατηρούμενη συμβολή των ελαστικά

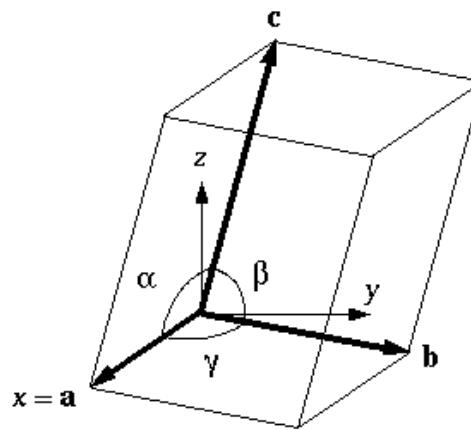
σκεδαζόμενων κυμάτων από τα δεσμευμένα ηλεκτρόνια, ενώ τα σήματα από την ανελαστική σκέδαση αντιμετωπίζονται ως θόρυβος. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν μέθοδοι που εκμεταλλεύονται ένα ελεγχόμενο τέτοιο σήμα για τον προσδιορισμό των φάσεων της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (SAD, MAD, βλέπε παρακάτω). Τα ελαστικά σκεδαζόμενα κύματα συμβάλλουν το ένα με το άλλο είτε επάνω στη ίδια φάση, είτε σε διαφορετική φάση είτε ακόμη και σε ενδιάμεση. Αυτό εξαρτάται από την κατεύθυνση των εισερχόμενων και εξερχόμενων κυμάτων και τις σχετικές θέσεις των ηλεκτρονίων μεταξύ τους. Η συνολική πορεία από την πηγή στον ανιχνευτή είναι αυτή που θα καθορίσει την συμβολή ή μη των κυμάτων. Εάν η διαφορά στην πορεία προκύπτει από ηλεκτρόνια που απέχουν κατά ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τα κύματα σκεδαζούν στη ίδια φάση και τα πλάτη τους θα προστεθούν. Αντίθετα, αν απέχουν ημιακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος θα συμβάλλουν ακριβώς σε αντίθετη φάση και θα αλληλοεξουδετερωθούν. Οι συνθήκες για να επιτευχθεί σκέδαση στη ίδια φάση μπορούν να συνοψιστούν αρκετά ικανοποιητικά εάν φανταστούμε τα κύματα να ανακλώνται σε επίπεδα που περνούν από τα άτομα. Η σχέση μεταξύ της γωνίας σκέδασης και του διαστήματος των δυο επιπέδων δίνεται από τον νόμο Bragg. Αν d είναι η απόσταση μεταξύ των επιπέδων μιας τέτοιας οικογένειας θα έχουμε ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ακτίνων σε γωνίες θ , όταν η διαφορά δρόμου που ακολουθούν $2d\sin\theta$, είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας λ . Επομένως,

$$2d \sin\theta = n \lambda \quad (n=1,2,3,\dots) \quad (2.1)$$

Ο νόμος του Bragg είναι θεμελιώδης στην κρυσταλλογραφία, επειδή η περιοδική διάταξη στο χώρο των κυψελίδων συνεπάγεται πως όμοια άτομα θα βρίσκονται στα ίδια επίπεδα. Άρα, παρατηρείται μια συμπεριφορά σκέδασης των ακτίνων-Χ από τα ηλεκτρόνια όμοιων ατόμων που σχηματίζουν ένα ατομικό επίπεδο. Επομένως, εάν γνωρίζουμε το μήκος κύματος των ακτίνων-Χ που εισέρχονται στον κρύσταλλο και μπορούμε να μετρήσουμε τη γωνία θ που σχηματίζουν οι προσπίπτουσες και οι εξερχόμενες του κρυστάλλου ακτίνες, τότε μπορούμε να υπολογίσουμε την απόσταση μεταξύ των ατομικών επιπέδων d (Σχήμα 2.4.α).



(α)



(β)

Σχήμα 2.4.α. Σχηματική απεικόνιση του νόμου Bragg, β . Ως διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας (unit cell), θεωρούνται οι τιμές των ακμών a , b , c και γωνιών α , β , γ .

Ο νόμος Bragg επιτρέπει να ρυθμίσουμε το μήκος κύματος, το διάστημα μεταξύ των επιπέδων και τη γωνία της πρόσπτωσης και της αντανάκλασης. Επομένως, εάν αυξηθεί το μήκος κύματος, η συνολική ένταση της περίθλασης γίνεται λιγότερο ευαίσθητη στο διάστημα ή στις αλλαγές της γωνίας. Αυτός σημαίνει ότι το σχέδιο περίθλασης γίνεται λιγότερο ευαίσθητο στις λεπτομέρειες. Επίσης, εάν διατηρηθεί το μήκος κύματος σταθερό αλλά μειωθεί το μεσοδιάστημα μεταξύ των επιπέδων, πρέπει να μεταβούμε σε υψηλότερες γωνίες για να πάρουμε την πρώτη ανάκλαση της περιθλώμενης ακτίνας. Λόγω αυτής της αντίστροφης σχέσης μεταξύ του εν λόγω

διαστήματος και της γωνίας της περίθλασης, ο χώρος που αναπαρίσταται η εικόνα περίθλασης καλείται «αντίστροφος χώρος». Όσο αυξάνεται ο αντίστροφος χώρος, τόσο μεγαλύτερη ευκρίνεια επιτυγχάνεται στον προσδιορισμό της πραγματικής εικόνας.

Ένας μονοκρυστάλλος χαρακτηρίζεται από την περιοδική επανάληψη στις 3 διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας (unit cell), που χαρακτηρίζεται από τις τιμές των ακμών \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} και γωνιών α , β , γ (σχήμα 2.4.β.). Λόγω της μετάθεσης της μοναδιαίας κυψελίδας και στις 3 διαστάσεις, ο κρύσταλλος αποτελείται θεωρητικά από άπειρες οικογένειες παράλληλων επιπέδων, που καθορίζονται από ίδιες οικογένειες ατόμων. Τα παράλληλα επίπεδα της κάθε οικογένειας θα απέχουν μεταξύ τους την ίδια απόσταση d_{hkl} . Τα h , k και l είναι ακέραιοι αριθμοί, αποτελούν τους δείκτες Miller και καθορίζουν τη θέση των ατομικών επιπέδων στο σύστημα συντεταγμένων του πραγματικού χώρου (Ευθύς χώρος, Direct space). Οι δείκτες αυτοί καθορίζουν τα επίπεδα Bragg που «κόβουν» την μοναδιαία κυψελίδα στις τρεις διαστάσεις της h , k και l φορές αντίστοιχα.

Ορίζουμε το διανύσμα, που είναι κάθετο στα παραπάνω επίπεδα και έχει μέτρο ίσο με το αντίστροφο της απόστασης των επιπέδων Bragg $|d^*hkl| = 1/d_{hkl} = (hkl)$. Τα διανύσματα ορίζουν τον αντίστροφο χώρο (χώρο ανακλάσεων), που είναι ο χώρος που μετράμε τις εικόνες περίθλασης. Περίθλαση υπάρχει όταν επαληθεύεται ο νόμος Bragg.

Στην πράξη, η συλλογή δεδομένων περίθλασης από μονοκρυστάλλο γίνεται ως εξής:

Ένας επιλεγμένος μονοκρυστάλλος τοποθετείται σε διαδρομή μονοχρωματικής ακτινοβολίας- X από την περίθλαση της οποίας προκύπτει πλήθος δευτερευουσών δεσμών. Οι δέσμες αυτές μπορούμε να θεωρήσουμε, σύμφωνα με τον νόμο Bragg ότι προέρχονται από ανάκλαση της αρχικής δέσμης στα επίπεδα hkl του κρυστάλλου. Ο κρύσταλλος πρέπει να έχει κατάλληλο όγκο, ώστε κατά τη συλλογή των δεδομένων να βρίσκεται μονίμως υπό δέσμη σταθερής έντασης. Κι αυτό γιατί κατά την περιστροφή του να μην υπάρχει σημείο που να δέχεται μειωμένη ένταση εξερχόμενο από τη δέσμη.

Η συλλογή των δεδομένων από την έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες- X γίνεται με χρήση ανιχνευτή, ο οποίος συλλέγει τις εντάσεις των ανακλάσεων. Ο ανιχνευτής είναι ουσιαστικό το ηλεκτρονικό ανάλογο των φωτογραφικών φιλμ, που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν. Οι τύποι ανιχνευτών που υπάρχουν είναι image plate, ανιχνευτές επιφάνειας (area detector), CCD (charge-coupled devices) που καταγράφουν μεγάλο αριθμό ανακλάσεων (σχήμα 2.5). Ο αριθμός των ανακλάσεων που μπορούμε να

συλλέξουμε εξαρτάται από την ένταση της προσπίπτουσας δέσμης, την ποιότητα του κρυστάλλου και το σύστημα συλλογής των δεδομένων.



Σχήμα 2.5. Ανιχνευτής MarCCD στην τερματική γραμμή X13 του EMBL

Με τη λήξη της συλλογής δεδομένων το σύνολο των ανακλάσεων υποβάλλεται σε επεξεργασία, καθώς επέρχονται τόσο γεωμετρικές όσο και διορθώσεις απορροφήσεως.

2.1.3. Επεξεργασία δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X

Ο όρος «Επεξεργασία Δεδομένων» χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλη την διαδικασία από την στιγμή συλλογής των εικόνων περίθλασης έως την δημιουργία μιας λίστας εντάσεων για όλες τις ανακλάσεις. Η επεξεργασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Αρχικά πραγματοποιείται δεικτοδότηση (indexing) των εικόνων περίθλασης, δηλαδή απόδοση δεικτών Miller στις κηλίδες και εύρεση κατάλληλης μοναδιαίας κυψελίδας στο πλέγμα με παράλληλη βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων του πειράματος (διαστάσεις κυψελίδας, προσανατολισμός κρυστάλλου, θέση ανιχνευτή, κα) Έτσι, δημιουργείται προφίλ της έντασης της κηλίδας, καθώς και κλασματοποιείται κάθε ανάκλαση, που προσδιορίζεται με τους δείκτες hkl . Τα

πιο κοινά προγράμματα που χρησιμοποιούνται είναι τα XDS (Kabsch, 2010), Mosflm (Leslie & Powell, 2007) και HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997).

- Εύρεση της ομάδας συμμετρίας χώρου. Η δεικτοδότηση του πλέγματος των κηλίδων από τις εικόνες περίθλασης μας παρέχει πληροφορίες για την μοναδιαία κυψελίδα, αλλά δεν δίνει καμιά ένδειξη για την συμμετρία του σχεδίου περίθλασης. Μόλις υπολογιστούν οι εντάσεις, μπορεί να καθοριστεί η συμμετρία της εικόνας περίθλασης (ομάδα Laue συν κάποιο πιθανό κέντρο συμμετρίας πλέγματος). Παράλληλα, είναι πιθανό να εντοπιστούν τυχόν άξονες συμμετρίας από τις συστηματικές απουσίες, που στις καλύτερες των περιπτώσεων μπορεί να οδηγήσουν σε μια αδιαμφισβήτητη ένδειξη της ομάδας χώρου. Το πρόγραμμα Pointless από την πλατφόρμα του CCP4 (Winn et al., 2011), μπορεί να χρησιμοποιηθεί εδώ.
- Κανονικοποίηση και συγχώνευση δεδομένων. Οι εντάσεις που υπολογίστηκαν με κατάλληλα προγράμματα δεν είναι όλες στην ίδια κλίμακα, εξαιτίας ενός συνδυασμού φυσικών παραγόντων του πειράματος, κι επομένως ένας αριθμός διορθώσεων πρέπει να εφαρμοστεί προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή εκτίμηση για την πραγματική ένταση αλλά και το πλάτος του παράγοντα δομής που απαιτούνται για τον καθορισμό της δομής. Για πολλαπλές μετρήσεις, με την εύρεση των παραγόντων κλίμακας (scale factors), υπολογίζεται μια μέση ένταση για κάθε μοναδική hkl ανάκλαση, αφού αυτό είναι το μοναδικό απαιτούμενο για τα προγράμματα καθορισμού της δομής. Το στάδιο της συγχώνευσης, παράλληλα, παρέχει ένα μεγάλο αριθμό στατιστικών στην ποιότητα των δεδομένων, κυρίως από την συμφωνία μεταξύ των συμμετρικά-συσχετισμένων παρατηρήσεων. Κανονικοποίηση και συγχώνευση δεδομένων μπορεί να γίνει με το πρόγραμμα Scala (CCP4).

2.1.4. Καθορισμός κρυσταλλικής δομής

2.1.4.α. Ένταση και παράγοντας δομής

Τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί αποτελούνται από ένα σύνολο εντάσεων I που προέρχεται από την ανάκλαση της ακτινοβολίας στα επίπεδα hkl , όπου περιέχονται πληροφορίες για τη θέση των ατόμων στο χώρο. Οι εντάσεις είναι πραγματικοί αριθμοί και αποτελούν πειραματικά μεγέθη, αλλά οι πληροφορίες που αφορούν τη θέση ατόμων περιέχονται στον μιγαδικό αριθμό που αποκαλείται **παράγων δομής** F_{hkl} που αντιστοιχεί στο hkl επίπεδο, στο οποίο ανακλάται η δέσμη και δίνεται από τον τύπο:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (2.2.)$$

όπου N το πλήθος των ατόμων της κυψελίδας και f_j ο ατομικός παράγοντας σκέδασης κάθε ατόμου j .

Η εικόνα περίθλασης συσχετίζεται με την κρυσταλλική δομή που προκαλεί περίθλαση μέσω μιας μαθηματικής συνάρτησης αποκαλούμενης μετασχηματισμός Fourier. Εάν εκφράσουμε την πυκνότητα ηλεκτρονίων ως μαθηματική συνάρτηση, τότε η εικόνα περίθλασης είναι ο μετασχηματισμός Fourier αυτής της συνάρτησης. Η μαθηματική σχέση μεταξύ της πυκνότητας ηλεκτρονίων σε σημείο $A(x,y,z)$ και του παράγοντα δομής είναι μια τριπλή σειρά Fourier:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{k}} \sum_{\mathbf{l}} F_{hkl} \exp(-2\pi i (hx + ky + lz)) \quad (2.3.)$$

όπου V είναι ο όγκος της κυψελίδας, F_{hkl} οι παράγοντες δομής.

Το F_{hkl} είναι ένας μιγαδικός αριθμός που εμπεριέχει το πλάτος και την φάση της ανάκλασης. Έτσι κάθε άτομο συμβάλλει στο πλάτος και τη φάση κάθε ξεχωριστής ανάκλασης. Αυτό δείχνει πως ένα σύνολο από μερικά στοιχεία μπορεί να δώσει πληροφορίες για ολόκληρη τη δομή.

Μια ιδιότητα του μετασχηματισμού κατά Fourier είναι ότι μπορεί να αναστραφεί. Έτσι, εάν εφαρμοστεί ο μετασχηματισμός Fourier σε κάποια συνάρτηση, είναι δυνατό να πάρουμε το αποτέλεσμα και το τρέξουμε μέσω ενός αντίστροφου μετασχηματισμού κατά Fourier, ανακτώντας την αρχική συνάρτηση. Ο αντίστροφος μετασχηματισμός κατά Fourier είναι ουσιαστικά ένας ακόμη μετασχηματισμός κατά Fourier. Έτσι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα γραφιστικά προγράμματα του ηλεκτρονικού υπολογιστή, που αναλύοντας την εικόνα περίθλασης δίνουν μια εικόνα της πυκνότητας των ηλεκτρονίων.

Στα πειράματα κρυσταλλογραφίας, τα δεδομένα αποτελούνται από ένα σύνολο εντάσεων από τις οποίες μπορεί να υπολογιστεί το μέτρο των παραγόντων δομής. Ωστόσο, καμμία πληροφορία δεν εξάγεται για την φάση, γεγονός του προκαλεί το λεγόμενο πρόβλημα φάσης.

2.1.4.β. Συνάρτηση Patterson

Η ηλεκτρονική πυκνότητα σε σημείο A (x,y,z) κυψελίδας συνδυάζοντας τις 2.2. και 2.3. δίνεται από τη σχέση:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{k}} \sum_{\mathbf{l}} |F_{\mathbf{hkl}}| \exp i(2\pi[(hx_j + ky_j + lz_j) - (hX + kY + lZ)]) \quad (2.4.)$$

Οπότε για ένα σημείο B(x+u,y+v,z+w) η πυκνότητα θα δίνεται από τη σχέση:

$$\rho(x+u, y+v, z+w) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{k}} \sum_{\mathbf{l}} |F_{\mathbf{hkl}}| \exp i(2\pi[(hx_j + ky_j + lz_j) - (h(x+u) + k(y+v) + l(z+w))]) \quad (2.5.)$$

όπου με τριπλό ολοκλήρωμα του γινομένου των δύο πυκνοτήτων έχουμε:

$$P(x, y, z) = \iiint_0^1 \rho(x, y, z) \rho(x+u, y+v, z+w) dx dy dz \quad (2.6.)$$

και με κατάλληλες προσεγγίσεις και μαθηματική επεξεργασία την τρισδιάστατη Patterson

$$P(u, v, w) = \frac{2}{V} \sum_n \sum_k \sum_l |F_{nkl}|^2 \cos(2\pi(hu + kv + lw)) \quad (2.7.)$$

Η συνάρτηση αυτή είναι μια σειρά Fourier με μηδενικές φάσεις και με συντελεστές τα τετράγωνα των παραγόντων δομής. Πρακτικά η Patterson χρησιμοποιείται όπως η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας μόνο που τα (x, y, z) αντικαθίστανται με τα (u, v, w) . Εντούτοις, υφίσταται σημαντική διαφορά στην ερμηνεία και σημασία των μεγίστων.

Τα μέγιστα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντιστοιχούν σε θέσεις ατόμων, δηλαδή συντεταγμένες του μεγίστου σημαίνουν και θέσεις του ατόμου. Στην Patterson μέγιστο $P(u, v, w)$ βρίσκεται σε OP απόσταση από την αρχή των συντεταγμένων και αντιστοιχεί στο μέτρο του διανύσματος $AB(u, v, w)$, που συνδέει τα άτομα $A(x, y, z)$ και $B(x+u, y+v, z+w)$. Εάν υπάρχουν και άλλα άτομα των οποίων κατά ζεύγη τα μεταξύ τους διανύσματα έχουν συντεταγμένες όμοιες με του $AB(u, v, w)$ τότε τα μέγιστά τους συμπίπτουν και έχουμε υπέρθεση μεγίστων- τέτοιο πράγμα δεν υφίσταται στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Η μέθοδος Patterson χαρακτηρίζεται διανυσματική επειδή βασίζεται σε κατανομή διανυσμάτων γύρω από την αρχή των αξόνων. Τα άκρα τους αντιστοιχούν σε μέγιστα της Patterson ενώ η ύπαρξή τους σε κυψελίδα προδίδει την ύπαρξη τουλάχιστον ενός ζεύγους ατόμων.

2.1.4.γ. Η επίλυση της δομής

Από το πλήθος των πειραματικών δεδομένων που έχουμε αρχικά πρέπει να βρεθεί ένα πρότυπο δομής που να περιλαμβάνει τις κατά προσέγγιση θέσεις κάποιων ατόμων που υπάρχουν στη δομή. Η εύρεση του αρχικού προτύπου δομής από τα πειραματικά δεδομένα είναι το δυσκολότερο στάδιο στη διαδικασία επίλυσης και συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των θεωρητικών κρυσταλλογράφων που προσπαθούν να αναπτύξουν νέες μεθόδους και υπολογιστικά προγράμματα. Για την επίλυση της δομής χρησιμοποιούνται οι άμεσες μέθοδοι, οι πειραματικές μέθοδοι (Απλή ισόμορφη αντικατάσταση [Simple Isomorphous Replacement, SIR], πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση [Multiple Isomorphous Replacement, MIR], πολλαπλή ανώμαλη διασπορά [Multiple-wavelength Anomalous Dispersion, MAD]) και η μοριακή αντικατάσταση [Molecular Replacement, MR].

⇒ Άμεσες Μέθοδοι

Οι άμεσες μέθοδοι δίνουν ένα αρχικό πρότυπο δομής αμέσως. Στηρίζονται στην απόδοση αυθαίρετων φάσεων σε λίγες ισχυρές ανακλάσεις από τις οποίες προκύπτουν βάσει πιθανοτήτων οι φάσεις ενός συνόλου ισχυρών ανακλάσεων. Από αυτές με μετασχηματισμό Fourier υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα και προκύπτει το αρχικό πρότυπο δομής. Οι άμεσες μέθοδοι απαιτούν διαχείριση πολύπλοκων μαθηματικών υπολογισμών και επομένως η εξέλιξή τους συμβαδίζει με αυτή της συνεχώς αυξανόμενης υπολογιστικής ισχύος.

⇒ Ισόμορφη αντικατάσταση (SIR, MIR)

Σε αυτήν την μέθοδο, η βασική ιδέα είναι η δημιουργία ενός κρυστάλλου, που είναι σχεδόν όμοιος με αυτόν που μελετάται, με την διαφορά πως μερικά άτομα έχουν αντικατασταθεί ή έχουν προστεθεί. Εάν ενσωματωθεί ένα "βαρύ" άτομο (π.χ. Hg, Pt, U, Br) στο υπό εξέταση μόριο, δηλαδή άτομο με μεγάλο ατομικό αριθμό, το σχέδιο περίθλασης θα διαταραχθεί. Έτσι, καθίσταται δυνατό να βρεθούν οι θέσεις λίγων βαρέων ατόμων και από αυτές να υπολογίσουμε τις πιθανές τιμές για τις γωνίες φάσης.

⇒ Ανώμαλη διασπορά ακτινοβολίας διαφορετικών μηκών κύματος, Multiple-wavelength Anomalous Dispersion (MAD)

Μια παρόμοια τεχνική χρησιμοποιεί μόνο έναν κρύσταλλο, ο οποίος περιέχει άτομα που προκαλούν ανελαστική (ανώμαλη) σκέδαση. Με την επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος των ακτίνων-X, μπορούμε να μεγιστοποιήσουμε αλλάξουμε το βαθμό στον οποίο τα άτομα αυτά διαταράσσουν την εικόνα περίθλασης, συλλέγοντας το ίδιο είδος πληροφοριών με την ισόμορφη αντικατάσταση. Αυτή η τεχνική, καλείται πολλαπλού μήκους κύματος ανώμαλη διασπορά (MAD).

⇒ Μοριακή Αντικατάσταση (MR)

Μοριακή αντικατάσταση είναι η τεχνική επίλυσης μιας άγνωστης δομής τοποθετώντας το ατομικό μοντέλο μιας γνωστής, η οποία εμφανίζει ικανοποιητική ομολογία με την υπό εξέταση δομή στην μοναδιαία κυψελίδα της άγνωστης, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αναπαράγει όσο το δυνατό καλύτερα τους παρατηρούμενους παράγοντες δομής. Σκοπός είναι η εύρεση ενός ατομικού μοντέλου, από το οποίο μπορεί να υπολογιστούν οι θεωρητικές φάσεις. Αλλά προκειμένου να ανοικοδομήσουμε ένα ατομικό μοντέλο από μια νέα κρυσταλλική μορφή, είναι απαραίτητο να βρεθεί ο προσανατολισμός και η

ακριβής θέση του μοντέλου μέσα στην νέα κυψελίδα. Προς τούτο το μοντέλο υπόκειται σε κατάλληλες περιστροφές και μετατοπίσεις στο χώρο ώστε να επιτευχθεί μία αρχική κατά προσέγγιση συμφωνία μεταξύ παρατηρούμενων και υπολογισμένων παραγόντων δομής.

Η MR μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επίλυση μιας δομής όταν υπάρχει διαθέσιμο ένα καλό μοντέλο για ένα αρκετά μεγάλο κλάσμα της δομής στον κρύσταλλο. Κατά κανόνα, η μέθοδος με τα σύγχρονα προγράμματα δουλεύει καλά αν το μοντέλο είναι πλήρες και παρουσιάζει πάνω από 30% ομολογία με την άγνωστη δομή. Η μέθοδος γίνεται πολύ πιο δύσκολη όταν το μοντέλο είναι ατελές ή παρουσιάζει χαμηλή ομολογία.

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στον καθορισμό κρυσταλλικής δομής γνωστού μορίου που έχει, όμως, κρυσταλλώσει σε διαφορετική ομάδα χώρου και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, όπου μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων παράγεται και μελετάται. Ακόμη και μια μικρή αλλαγή στην ακολουθία μπορεί να μεταβάλλει τον τρόπο που κρυσταλλώνει η πρωτεΐνη. Παράλληλα, είναι χρήσιμη σε μελέτες πρόσδεσης ή σχηματισμού συμπλόκων πρωτεϊνών, που είχαν προηγουμένως επιλυθεί. Καθώς ο αριθμός των γνωστών δομών αυξάνεται, γίνεται προφανές πως ο τρόπος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι περιορισμένος και ακόμη και λειτουργικώς διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να αναδιπλώνονται με παρόμοιο τρόπο. Επομένως, είναι πιθανό μια νέα πρωτεΐνη να παρουσιάζει δομή όμοια με ήδη γνωστή και η MR να αποτελεί έναν εύκολο τρόπο επίλυσης.

Το γνωστό μοντέλο, όταν τοποθετηθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των φάσεων, οι οποίες σε συνδυασμό με τα μέτρα των παρατηρούμενων παραγόντων δομής της άγνωστης δομής, επιτρέπουν την κατασκευή και βελτιστοποίηση του μοντέλου. Ο υπολογισμός περιλαμβάνει μια έρευνα Patterson σε 6 διαστάσεις για όλες τις πιθανές κατευθύνσεις και μετατοπίσεις του γνωστού μοντέλου στην κυψελίδα της άγνωστης δομής. Επειδή είναι χρονοβόρος, συνήθως εφαρμόζεται σε δυο φάσεις:

- μια έρευνα σε 3 διαστάσεις για όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς προκειμένου να καθοριστεί αυτή του μοντέλου.
- μια έρευνα σε 3 διαστάσεις για όλες τις πιθανές μετατοπίσεις προκειμένου να καθοριστεί αυτή του μοντέλου.

Κατά την MR πρώτα δημιουργείται ένα προκαταρτικό μοντέλο της κρυσταλλικής δομής προσανατολίζοντας (περιστρέφοντας) και έπειτα τοποθετώντας (μετατοπίζοντας) το μοντέλο στο κρυσταλλικό πλέγμα. Έχοντας πετύχει την σωστή διευθέτηση και θέση μπορούμε να υπολογίσουμε τις φάσεις από το μοντέλο και να τις συνδυάσουμε με τους παράγοντες δομής. Οι παράγοντες δομής που προκύπτουν και ο αντίστοιχος χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, περιέχουν μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με το αρχικό μοντέλο αλλά συνήθως είναι αρκετά κοντά στις σωστές τιμές για να ξεκινήσει μια επιτυχής διαδικασία βελτιστοποίησης.

Η μοριακή αντικατάσταση στηρίχθηκε αρχικά στις ιδιότητες της συνάρτησης Patterson. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται ακόμη σε προγράμματα όπως το Molrep από την πλατφόρμα του CCP4 και το AmoRe (Trapani & Navaza, 2008). Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν μέθοδοι που βασίζονται στη Μέγιστη Πιθανοφάνεια, όπως το PHASER (McCoy et al., 2007).

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο (2.4.1.β.), ο χάρτης Patterson είναι χάρτης διανυσμάτων, με κορυφές στις θέσεις των διανυσμάτων μεταξύ των ατόμων της μοναδιαίας κυψελίδας.

Τα διανύσματα ανάμεσα σε αυτά τα άτομα δημιουργούν τον χάρτη Patterson. Αν και τα διανύσματα είναι άγνωστα για μια δομή, τα μέγεθος της πρωτεΐνης, ο τρόπος που τα μόριά τους συνδέονται μεταξύ τους παρέχουν την υπογραφή της πρωτεϊνικής δομής. Τα διανύσματα στο χάρτη Patterson χωρίζονται σε α. ενδομοριακά διανύσματα (από ένα άτομο του μορίου σε άλλο άτομο του ίδιου μορίου), που εξαρτώνται μόνο από την διευθέτηση του μορίου, και όχι από την θέση τους στην κυψελίδα και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην συνάρτηση περιστροφής και β. τα διαμοριακά διανύσματα εξαρτώνται τόσο από την διευθέτηση, όσο και την θέση και συνεπώς όταν η διευθέτηση είναι γνωστή, μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην συνάρτηση μετατόπισης.

Η συνάρτηση περιστροφής χρησιμοποιείται για την εύρεση της σωστής διευθέτησης του μοντέλου στο κρυσταλλικό πλέγμα. Αυτό επιτυγχάνεται εξετάζοντας την συμφωνία ανάμεσα στις συναρτήσεις Patterson που υπολογίζονται από το μοντέλο και από δεδομένα από διάφορες σχετικές θέσεις. Η συνάρτηση περιστροφής, όπως προαναφέρθηκε, εκμεταλλεύεται το γεγονός πως τα ενδομοριακά ανύσματα εξαρτώνται

μόνο από την διευθέτηση του μορίου, όχι από την θέση του στην κυψελίδα. Όταν μετακινούμε ένα μόριο στην κυψελίδα, όλα τα άτομα του μορίου μετακινούνται το ίδιο, αλλά τα διανύσματα μεταξύ τους παραμένουν τα ίδια. Γενικά, τα ενδομοριακά διανύσματα είναι έχουν μικρότερο μέτρο από τα διαμοριακά, κι έτσι η συνάρτηση περιστροφής υπολογίζεται μόνο στο τμήμα του χάρτη που βρίσκεται κοντά στην αρχή, μειώνοντας έτσι το θόρυβο που προκύπτει από τα διαμοριακά διανύσματα.

Η συνάρτηση περιστροφής μπορεί να θεωρηθεί ως μια συνέλιξη στον χώρο περιστροφής. Σε εκείνη την θέση (κατεύθυνση) που το μοντέλο τοποθετείται μέσα στον κρύσταλλο, το γινόμενο των των δυο Patterson (χαρτών που προκύπτουν από ενδοατομικά διανύσματα) θα πρέπει να έχει την μέγιστη τιμή. Η συνάρτηση έχει την μορφή:

$$R(C) = \int_U P_1(\mathbf{x}) P_2(\mathbf{x}') dV \quad (2.8.)$$

όπου P_1 και P_2 είναι οι 2 συναρτήσεις Patterson, C είναι μια μήτρα που ορίζει την περιστροφή του χ ως προς το χ' , και U είναι ο όγκος της ολοκλήρωσης.

Αρχικά, η συνάρτηση υπολογιζόταν με άμεση σύγκριση δυο Patterson ή λίστες κορυφών των δυο Patterson. Τα περισσότερα προγράμματα χρησιμοποιούν τώρα μια γρήγορη συνάρτηση περιστροφής, βασισμένη σε έναν αλγόριθμο που αναπτύχθηκε αρχικά από τον Tony Crowther (μέθοδος του γρήγορου μετασχηματισμού Fourier, 1972). Κατά την προσέγγιση αυτή, η πυκνότητα Patterson αναπτύσσεται σε μια σφαίρα σε σφαιρικούς αρμονικούς όρους Bessel, ώστε να διευκολύνεται η περιστροφή των σφαιρικών όγκων. Η συνάρτηση περιστροφής στο AmoRe βασίζεται στην ίδια θεωρία.

Συχνά υπάρχει πάνω από ένα μόριο (υπομονάδα) στην ασύμμετρη μονάδα. Μια συνάρτηση αυτοπεριστροφής που είναι μια συνάρτηση περιστροφής όπου η φυσική Patterson συγκρίνεται με τον εαυτό της, μπορεί να υπολογιστεί σε αυτές τις περιπτώσεις για να βρεθεί ο μετασχηματισμός για την υπέρθεση των δυο διαφορετικών μορίων. Η συνάρτηση αυτοπεριστροφής παρουσιάζει μια έντονη κορυφή στην αρχή της, που αντιστοιχεί σε μηδενική περιστροφή, και όλες οι άλλες κορυφές είναι σχετικά μικρές. Υπολογίσουμε την μέση και τυπική απόκλιση για όλες τις τιμές μετά την απομάκρυνση της αρχής. Εάν μια κορυφή υπερβαίνει κατά πέντε φορές την τυπική απόκλιση είναι

σημαντική. Αν είναι ασθενέστερη μπορεί να εξακολουθεί να είναι σημαντική αλλά θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό.

Η θέση που προκύπτει από τέλεση αυτοπεριστροφής πρέπει να είναι σύμφωνη με την τέλεση κατάλληλης περιστροφής του αρχικού μορίου. Επιπροσθέτως, αν το μόριο είναι συμμετρικό (π.χ. διμερές ή τετραμερές), η λύση θα πρέπει να είναι σε συμφωνία με το κατάλληλο στοιχείο συμμετρίας.

Η συνάρτηση μετατόπισης τοποθετεί το μοντέλο με την σωστή θέση στην ασύμμετρη μονάδα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ταιριάζει όσο το δυνατό καλύτερα με τα δεδομένα που παρατηρήθηκαν.

Το σήμα από την συνάρτηση μετατόπισης είναι γενικά ισχυρότερο από εκείνο της συνάρτησης περιστροφής. Για αυτό στην πράξη παίρνουμε πολλαπλές λύσεις της συνάρτησης περιστροφής και εφαρμόζουμε την συνάρτηση μετατόπισης ξεχωριστά για κάθε μια, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της συνάρτησης μετατόπισης για να προσδιορίσουμε την σωστή κατεύθυνση. Η διαδικασία γίνεται αυτόματα από υπολογιστικά προγράμματα.

Ο χώρος που θα εξεταστεί για τον προσδιορισμό της μετατόπισης εξαρτάται από την ομάδα χώρου. Για παράδειγμα, στην $P1$, δεν απαιτείται συνάρτηση μετατόπισης, αφού η αρχή της μοναδιαίας κυψελίδας μπορεί να οριστεί τυχαία.

Οι συναρτήσεις μετατόπισης συγκρίνουν σύνολα διαμοριακών διανυσμάτων (τα οποία εξαρτώνται από την θέση του μορίου στην μοναδιαία κυψελίδα) με τις παρατηρούμενες Patterson.

Όπως και με την συνάρτηση περιστροφής, ο ορισμός της συνάρτησης μετατόπισης με βάση της Patterson είναι ένα γινόμενο συναρτήσεων. Πρώτα, χρειαζόμαστε έναν μαθηματικό ορισμό του υποσυνόλου της υπολογιζόμενης Patterson που να αντιστοιχεί στα εξωμοριακά ανύσματα. Αυτό που θέλουμε είναι τα διανύσματα από τα συμμετρικά μόρια (ρ_2) στα αρχικά (ρ_1). Όπως και ο χάρτης Patterson είναι μια συνάρτηση αυτό-συσχέτισης (π.χ. μια συνάρτηση συσχέτισης της πυκνότητας με τον εαυτό της), το σύνολο των διαμοριακών διανυσμάτων είναι μια συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας για ένα μόριο και εκείνης για ένα άλλο, όπως δείχνει η εικόνα και η εξίσωση. Η συνάρτηση συσχέτισης μπορεί να υπολογιστεί με έναν απλό μετασχηματισμό Fourier, χρησιμοποιώντας το θεώρημα της συσχέτισης.

$$P_{2 \rightarrow 1}(u) = \int_V \rho_1(x) \rho_2(x-u) dx \quad (2.9.)$$

Η απαιτούμενη μετατόπιση, σε σχέση με τον άξονα 2^{ης} τάξης, μπορεί να καθοριστεί μετακινώντας τα διαμοριακά διανύσματα πάνω στον παρατηρούμενο χάρτη Patterson και υπολογίζοντας την συνάρτηση γινόμενο. Όταν βρεθεί η σωστή μετατόπιση, θα υπάρξει μια μεγάλη κορυφή, αφού τα διανύσματα θα συμπίπτουν.

$$T(t) = \int P_{2 \rightarrow 1}(u-t) P_o(u) du \quad (2.10.)$$

Το θεώρημα συσχέτισης υποδεικνύει πως η συνάρτηση μετατόπισης μπορεί να υπολογιστεί με έναν απλό μετασχηματισμό Fourier.

Είναι εύκολο να ερμηνεύσουμε μια συνάρτηση που δίνει το διάνυσμα μετατόπισης κατευθείαν και μειώνει σημαντικά τον θόρυβο χειριζόμενοι όλες τις πράξεις συμμετρίας ταυτόχρονα. Ο πιο κοινός τρόπος είναι ο υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης ανάμεσα στα παρατηρούμενα και τα υπολογισμένα τετράγωνα των πλατών, ως συνάρτηση της μετατόπισης του μοντέλου. Η σωστή μετατόπιση θα δώσει μια κορυφή στον χάρτη.

$$C(t) = \frac{\sum(|F_o|^2 - \overline{|F_o|^2})(|F_c(t)|^2 - \overline{|F_c(t)|^2})}{\sqrt{\sum(|F_o|^2 - \overline{|F_o|^2})^2 (|F_c(t)|^2 - \overline{|F_c(t)|^2})^2}} \quad (2.11.)$$

Αποδεικνύεται τελικά πως λόγω του θεωρήματος Parseval, αυτός ο συντελεστής είναι ίσος με εκείνον μεταξύ των δυο Patterson που μετακινήθηκαν από την αρχή. Για αυτόν τον λόγο συνήθως λέγονται Patterson correlation (PC)

Οι PC έρευνες πραγματοποιούνται και με τα προγράμματα CNS (Brunger et al., 1998) και AmoRe, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Το τελευταίο δίνει τα

PC σκορ ως έναν τρόπο αξιολόγησης της ποιότητας των λύσεων της μοριακής αντικατάστασης.

2.1.4.δ. Ανοικοδόμηση μοντέλου

Κατά την Ανοικοδόμηση Μοντέλου (Model building) ερμηνεύεται ένας χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας αποδίδοντας σε αυτόν ατομικές συντεταγμένες. Το πιο κοινό πρόγραμμα για αυτήν την εργασία είναι το Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Αρχικά, δεν βλέπουμε το ίδιο το μοντέλο, αλλά μόνο την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Ωστόσο, η περιγραφή του μοντέλου με όρους ατόμων και δεσμών είναι πιο χρήσιμη από χημική-βιολογική πλευρά, και επομένως μια τέτοια περιγραφή προσπαθούμε να εξάγουμε από την πυκνότητα. Για να ερμηνευτεί ένας χάρτης χαμηλής διακριτότητας είναι απαραίτητη η χρήση πρωτύτερης χημικής γνώσης. Μη αναμενόμενα χαρακτηριστικά (π.χ. στην περιοχή του διαλύτη) συχνά δεν ερμηνεύονται σωστά.

Το αρχικό πρότυπο δομής συνήθως δεν περιλαμβάνει όλα τα άτομα που υπάρχουν στην κυψελίδα. Η εύρεση των υπολοίπων γίνεται με χρήση διαδοχικών χάρτων διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας, οι οποίοι προκύπτουν ως εξής: Από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που υπολογίζεται με μετασχηματισμό Fourier των παραγόντων δομής όλων των ανακλάσεων αφαιρείται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στα άτομα των οποίων η θέση είναι ήδη γνωστή. Αφού στα μέγιστα του χάρτη διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντιστοιχούν άτομα, με διαδοχικούς υπολογισμούς χαρτών διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας βρίσκονται και τα υπόλοιπα άτομα.

Τα άτομα που υπήρχαν στο αρχικό πρότυπο δομής μαζί με αυτά που αποκαλύπτονται με αλληπάλληλους χάρτες διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας τελικά πρέπει να σχηματίζουν ένα σύνολο, που να έχει χημική σημασία. Μέγιστα, που φανερώνουν πιθανή θέση ατόμου, αλλά δεν έχουν καμία χημική σημασία ως προς το υπόλοιπο σύνολο ατόμων απορρίπτονται. Τα άτομα που έχουν αποκαλυφθεί δεν βρίσκονται στις τελικές τους θέσεις αλλά σε κάποιες προσεγγιστικές και η διευθέτησή τους στις τελικές θέσεις πρέπει να γίνει με τρόπο ώστε να αντιστοιχούν σε σωστές τιμές αποστάσεων δεσμών και γωνιών. Η μετατόπιση των ατόμων γίνεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

Τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία της δομής βελτιώνουν τις θέσεις των ατόμων με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και κατόπιν υπολογίζουν τον χάρτη διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας ώστε να βρεθούν άτομα που δεν ήταν γνωστό ότι υπάρχουν στην ασύμμετρη μονάδα ή άτομα κοντά στα ήδη υπάρχοντα τα οποία οφείλονται σε αποδιάταξη της δομής ή μόρια διαλύτη, για παράδειγμα νερού. Εκτός από τις συντεταγμένες των ατόμων, υπολογίζονται και οι θερμικές τους παράμετροι. Κάθε άτομο συνοδεύεται από τουλάχιστον μία παράμετρο που αντιστοιχεί σε ισότροπη θερμική κίνηση του ατόμου. Οι ισοτροπικές θερμικές παράμετροι μπορούν να αντικατασταθούν από ανισότροπες. Για την περιγραφή ανισοτροπικής θερμικής κίνησης απαιτούνται έξι αντί μιας παράμετροι. Η εισαγωγή ανισοτροπικών παραγόντων θερμικής κίνησης για N άτομα αυξάνει το πλήθος των παραμέτρων από $4N$ σε $9N$ και οδηγεί σε υπερπροσαρμογή (overfitting) την επεξεργασία του μοντέλου, ιδιαίτερα όταν τα πειραματικά δεδομένα (ανακλάσεις) είναι περιορισμένα. Για το λόγο αυτό η εισαγωγή παραγόντων θερμικής κίνησης πρέπει να γίνεται προσεκτικά και σε περιορισμένο αριθμό ατόμων της υπό εξέταση δομής, ώστε ο λόγος παρατηρούμενων ανακλάσεων προς παραμέτρους να μην δημιουργεί προβλήματα υπερπροσαρμογής του μοντέλου.

2.1.4.ε. Βελτιστοποίηση δομής

Βελτιστοποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία οι τιμές των παραμέτρων βελτιστοποιούνται με μαθηματικές μεθόδους στατιστικής προσαρμογής [Ελάχιστα Τετράγωνα (Least Squares, L.S.) και Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood)], ώστε το τελικό μοντέλο να συμφωνεί όσο το δυνατό καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα.

Ένα σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της πορείας βελτιστοποίησης είναι οι τιμές των δεικτών αξιοπιστίας της δομής. Ο παράγοντας αξιοπιστίας R (R_{cryst} ή R_1) αποκαλύπτει την συμφωνία μεταξύ των πειραματικών τιμών όλων των παραγόντων δομής $|F_o|$ και των αντίστοιχων υπολογιζόμενων $|F_c|$ και δίνεται από τη σχέση:

$$R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|} \quad (2.12)$$

Ένας άλλος δείκτης αξιοπιστίας, για πρωτεϊνικές δομές είναι ο R_{free} , που δίνεται από την ίδια σχέση (2.12), αλλά για τον υπολογισμό του χρησιμοποιείται ένα τυχαίο υποσύνολο ανακλάσεων, που δεσμεύεται στην αρχή της διαδικασίας της βελτιστοποίησης και δεν υπόκειται σε επεξεργασία βελτιστοποίησης. Συνήθως δεσμεύεται το 10% των ανακλάσεων.

Όσον αφορά δομές μικρού-μεσαίου μεγέθους, συνήθως ελέγχεται και ένας δείκτης αξιοπιστίας με στατιστικό βάρος (w), που δίνεται από τη σχέση:

$$wR = \left[\frac{\sum (F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w F_o^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.13)$$

Κατά την διαδικασία της βελτιστοποίησης πρέπει επίσης να ελέγχονται εκτός από τη συμφωνία πειραματικών και υπολογισθέντων δεδομένων, οι παράμετροι και οι περιορισμοί-εξαναγκασμοί (restrains-costrains). Παράμετροι ενός μοντέλου θεωρούνται:

1. Ανεξάρτητες συντεταγμένες x,y,z (κλασματικές ή πραγματικές)
2. Θερμικοί παράγοντες (ισοτροπικοί ή ανισοτροπικοί)
3. Αριθμός κατάληψης, που για τις πρωτεΐνες συνήθως σταθεροποιείται στο 1.0. Ωστόσο, αποδιάταξη (αριθμός κατάληψης < 1.0) μπορεί να υπάρξει για εναλλακτικές διαμορφώσεις κάποιων αμινοξέων, προσδέτες και μόρια νερού. Στα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών, τα μικρά ξενιζόμενα μόρια, που εντοπίζονται στην κοιλότητα των CDs είναι σχεδόν πάντα αποδιατεταγμένα.

Σε κάθε βήμα της βελτιστοποίησης πρέπει να ελέγχονται και να εφαρμόζονται περιορισμοί, που θεωρούνται ως επιπρόσθετες παρατηρήσεις (βάσει γεωμετρίας). Οι περιορισμοί αφορούν:

- Επιτρεπτές δίεδρες γωνίες συστροφής ϕ και ψ , σύμφωνα με το διάγραμμα Ramachandran (Ramachandran Plot).
- Μήκη των δεσμών και γωνίες μεταξύ των δεσμών
- Χειρομορφία
- Δεσμοί Van der Waals, π - π αλληλεπιδράσεις, υδρογονικοί δεσμοί, κα
- Περιορισμοί βάσει μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας (Non Crystallographic Symmetry, NCS)

- Η μοριακή διάταξη στον χώρο

Κάθε περιορισμός χρειάζεται να εφαρμόζεται κατάλληλα, και οι γεωμετρικοί φέρουν επίσης ένα συνολικό στατιστικό βάρος (weight) στον υπολογισμό των πειραματικών δεδομένων. Σημαντικής σημασίας είναι η επιλογή μοντέλου παραμετροποίησης. Όπως αναφέρθηκε, το μοντέλου του μορίου που μελετάμε μπορεί να υποστεί παραμετροποίηση με διάφορους τρόπους. Αυτή εξαρτάται κυρίως από την αναλογία δεδομένων/παραμέτρων.

Στο σημείο αυτό θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στην μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων:

Κάθε άτομο χαρακτηρίζεται από τις παραμέτρους θέσης (x,y,z) και τον ισοτροπικό θερμικό συντελεστή U ή τους ανισοτροπικούς $U_{i,j}$. Στη βελτιστοποίηση με ισοτροπικό συντελεστή σε κάθε άτομο αντιστοιχούν τέσσερις μεταβλητές x,y,z,U και το σύνολο των μεταβλητών είναι $M=4N+1$ για κρύσταλλο με N άτομα στην ασύμμετρη μονάδα. Σε βελτιστοποίηση με ανισοτροπικούς θερμικούς συντελεστές, οι μεταβλητές για κάθε άτομο γίνονται εννιά και το σύνολο των μεταβλητών στην ασύμμετρη μονάδα $M=9N+1$. Οι τιμές του M καθορίζονται από τον αριθμό των ανεξάρτητων ανακλάσεων, που παρατηρήθηκαν στο πείραμα. Σε περιπτώσεις κρυσταλλογραφικών πειραμάτων, δομών μικρού-μεσαίου μεγέθους, που φτάνουν σε ατομική διακριτότητα, ο λόγος πλήθους ανεξάρτητων ανακλάσεων προς το πλήθος των χρησιμοποιούμενων μεταβλητών βελτιστοποίησης δεν πρέπει να είναι μικρότερος του έξι. Σε πρωτεϊνικές δομές, ο λόγος αυτός μπορεί να είναι μικρότερος.

Σκοπός της χρήσης της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων είναι η βελτιστοποίηση της δομής μέσω ελαχιστοποίησης του Q που δίνεται από τη σχέση

$$Q = \sum w \left(|F_o| - \frac{1}{K} |F_c| \right)^2 \quad (2.14)$$

όπου : w το στατιστικό βάρος που βρίσκεται σε αντίστροφη σχέση με το σφάλμα $\sigma(F_o)$, $|F_o|$ οι πειραματικές τιμές και $|F_c|$ οι υπολογιζόμενες και K ο παράγοντας κλίμακας (scale factor).

Το άθροισμα στη σχέση 1.14. αφορά τις συμμετρικά ανεξάρτητες ανακλάσεις. Αρχικά θεωρούμε $w=1$ και $K=1$. Ο υπολογισμός των M παραμέτρων και του παράγοντα κλίμακας γίνεται υπολογίζοντας τις πρώτες μερικές παραγώγους του Q ως προς τις

αντίστοιχες παραμέτρους και εξισώνοντας με μηδέν. Τότε προκύπτει σύστημα $M+1$ εξισώσεων με άγνωστους τις παραμέτρους και συντελεστές αθροίσματα των τιμών F_0 και F_c . Οι νέες τιμές των παραμέτρων και του παράγοντα κλίμακας δίνονται από τη λύση του συστήματος. Η διαδικασία βελτιστοποίησης επαναλαμβάνεται με διαδοχικούς κύκλους ελαχίστων τετραγώνων και στο τέλος κάθε κύκλου λαμβάνεται το κριτήριο συμφωνίας μεταξύ των πειραματικών τιμών $|F_0|$ και των αντίστοιχων υπολογιζόμενων $|F_c|$ που δίνεται από τις σχέσεις 1.12. και 1.13.

2.1.4.στ. Αξιολόγηση και κατάθεση δομής

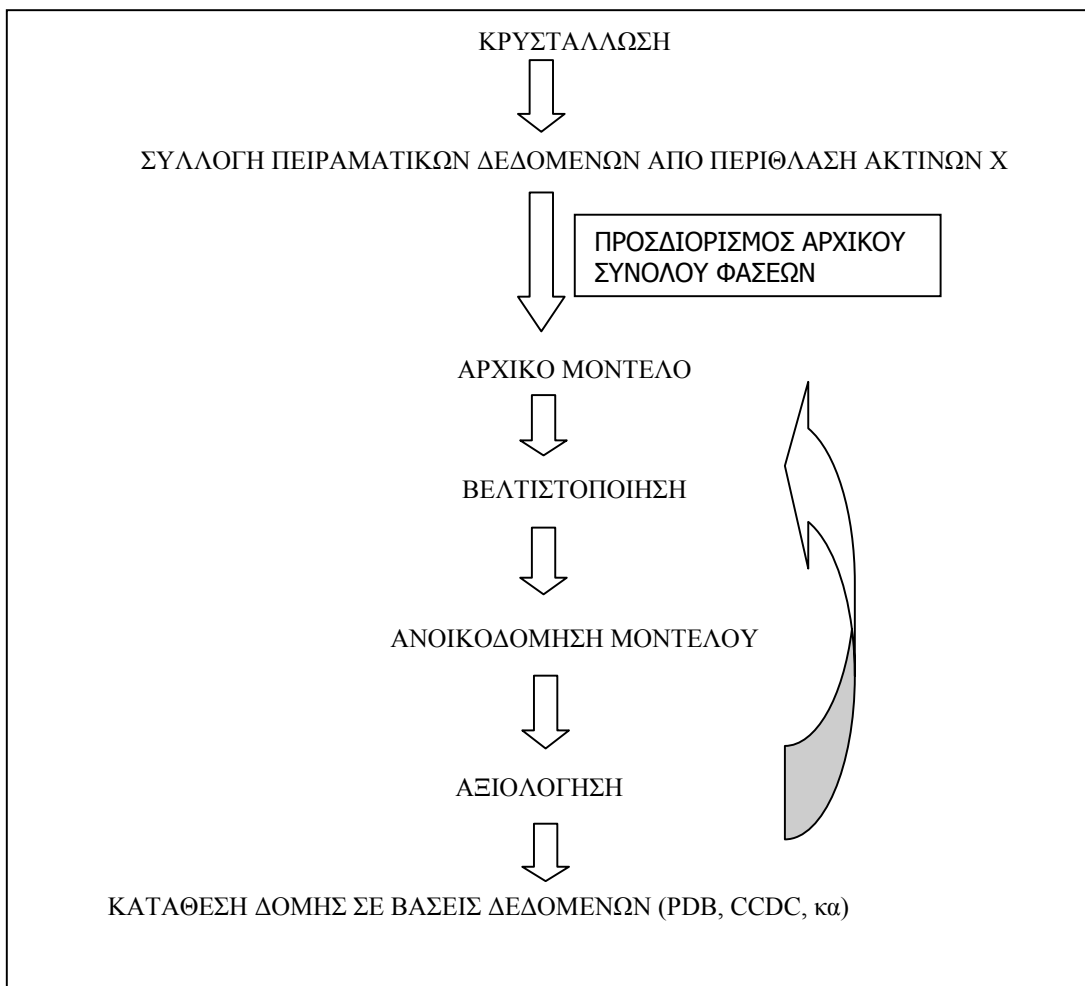
Σε κάθε βήμα γίνεται αποτίμηση της ποιότητας του ατομικού μοντέλου. Η αποτίμηση πραγματοποιείται με βάση τα πειραματικά δεδομένα και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου. Ένα καλό μοντέλο πρέπει να είναι: (i.) Στατιστικώς ορθό. Το μοντέλο να παρέχει μια στατιστικώς συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα (R -factor, ka) και να μην περιέχει σημαντικές (μη ερμηνεύσιμες) κορυφές στο διαφορικό χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, (ii.) Χημικώς ορθό. Η γεωμετρία του να είναι σύμφωνη με τυχόν χημικούς περιορισμούς. Το διάγραμμα Ramachandran να μην περιέχει αποκλίσεις κάτω από 1% και να μην υπάρχουν χημικές ασυμβατότητες και (iii.) Βιολογικώς ορθό. Το χημικό περιβάλλον που εντοπίζονται τα αμινοξέα να είναι κατάλληλο και σύμφωνο με άλλες βιοχημικές παρατηρήσεις.

Η βελτιστοποίηση της δομής θεωρείται ότι έχει τελειώσει εάν ικανοποιούνται οι εξής όροι:

1. Έχουν βρεθεί όλα τα άτομα της ασύμμετρης μονάδας. Θεωρείται ότι δεν υπάρχει άτομο που να μην έχει εντοπισθεί όταν τα μέγιστα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που εντοπίζεται είναι μικρότερα του $1 e/\text{\AA}^3$.
2. Ο λόγος της μέγιστης μετατόπισης (με εφαρμογή ελαχίστων τετραγώνων) προς το μέγιστο σφάλμα είναι σημαντικά μικρότερος της μονάδας.
3. Ο συντελεστής αξιοπιστίας R έχει τη μικρότερη δυνατή τιμή. Αποδεκτή τιμή για υπερμοριακά σύμπλοκα (π.χ. σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών) είναι μία κοντά στο 0,1 και για τις πρωτεΐνες κοντά στο 0,2.

Ο τελικός έλεγχος της ορθότητας της κρυσταλλικής δομής μπορεί να πραγματοποιηθεί με πλήθος υπολογιστικών προγραμμάτων. Για τις πρωτεϊνικές δομές χρησιμοποιούνται τα Procheck (Laskowski & MacArthur, 1993) και MolProbity (Chen et al., 2010), ενώ για μικρά μόρια το Checkcif/PLATON (Spek, 2009). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την κατάθεση (deposit) των ατομικών συντεταγμένων και των παραγόντων δομής σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων (Protein Data Bank, PDB για πρωτεΐνες και Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC για υπερμοριακά σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών).

Στο σχήμα 2.6. απεικονίζεται το διάγραμμα ροής ολόκληρης της πειραματικής διεργασίας αρχής γενομένης από την κατασκευή του κρυστάλλου έως την συλλογή και αποθήκευση των στοιχείων της δομής.



Σχήμα 2.6. Διάγραμμα ροής κρυσταλλογραφικής μελέτη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ-Α ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΗΣ

3.1. Έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου της Κυκλοφιλίνης Α και μεταλλαγμάτων της

3.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με το kit της εταιρίας QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ένζυμο περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA γίνονται σε τελικό όγκο ο οποίος εξαρτάται τόσο από την ποσότητα και καθαρότητα του DNA όσο και από τη ποσότητα του ενζύμου περιορισμού, το οποίο χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

Για μία τυπική πέψη (τελικού όγκου 30 μl) αναμιγνύονται:

- διάλυμα DNA 10 μl
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα 3 μl
- ένζυμο περιορισμού 1 μl (1 unit/μl)
- δις απιονισμένο και αποστειρωμένο ύδωρ (ddH₂O) 15 μl

Το μίγμα επωάζεται στην ιδανική θερμοκρασία για τη δράση του ενζύμου περιορισμού για 2 έως 3 ώρες και στη συνέχεια αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης.

Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

- Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής. Η αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml και αναμιγνύεται καλά.
- Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση,

αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, στα "πηγαδάκια" που σχηματίστηκαν.

- Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.

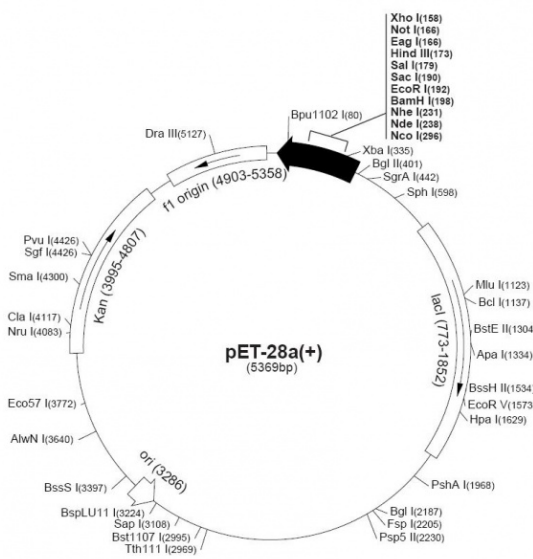
» διάλυμα ηλεκτροφόρησης 50x TAE: 24.2% (w/v) Tris, 57.1 ml/l CH₃COOH, 100 ml/l 0.5 M EDTA

» ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλένιου, 35% γλυκερόλη

3.1.2. Υποκλωνοποίηση τμήματος νουκλεϊνικών οξέων σε πλασμιδιακό φορέα

Προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας pET-28a (σχήμα 3.1.) υποβάλλεται σε πέψη με τα επιθυμητά ένζυμα περιορισμού (*Bam*HI και *Xho*I).



Σχήμα 3.1. Ο πλασμιδιακός χάρτης pET-28a(+) του φορέα μετασηματισμού κυττάρων *E. coli*

Ενσωμάτωση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του τμήματος DNA που πρόκειται να ενσωματωθεί στον πλασμιδιακό φορέα, εξαρτάται από το σχετικό μέγεθός τους. Η συνολική συγκέντρωση και των δύο, δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10 ng/μl.

Για μία τυπική αντίδραση ενσωμάτωσης (τελικού όγκου 10 μl), αναμιγνύονται:

- πλασμιδιακός φορέας 1 μl
- DNA προς ενσωμάτωση 1 μl
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα 1 μl
- T4 DNA λιγάση 1 μl (1 unit/μl)
- ddH₂O 6 μl

Το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 14 ώρες περίπου.

3.1.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μια τυπική αντίδραση ενίσχυσης περιλαμβάνει το δείγμα DNA, το οποίο αποτελεί τη μήτρα της αντίδρασης, μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση, δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Τα συστατικά αναμιγνύονται και τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος επωάζει το μίγμα σε μία σειρά διαφορετικών θερμοκρασιών και για διαφορετικό χρόνο, η οποία αναφέρεται σαν ένας κύκλος ενίσχυσης. Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών, οι θερμοκρασίες και η χρονική διάρκεια εφαρμογής τους εξαρτώνται από τις ιδιαίτερες συνθήκες του εκάστοτε πειράματος. Κάθε κύκλος ενίσχυσης, θεωρητικά διπλασιάζει το προς ενίσχυση τμήμα DNA και αποτελείται από διαδοχικά στάδια. Το πρώτο στάδιο του κύκλου αποδιατάσσει το προς ενίσχυση δείγμα DNA, θερμαίνοντάς το στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Στο επόμενο στάδιο, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές υβριδίζονται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες της μήτρας, σε θερμοκρασία 40-60°C για 30-60 δευτερόλεπτα. Τελικά, η σύνθεση νέου DNA αρχίζει με την άνοδο της θερμοκρασίας για 1-2 λεπτά, στη βέλτιστη τιμή για τη δράση της θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία, συνήθως, είναι 74°C. Με αυτό το στάδιο ολοκληρώνεται ένας κύκλος και μετά

από 20-40 κύκλους, το προϊόν της ενίσχυσης αναλύεται ή χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

Για μία τυπική αντίδραση ενίσχυσης (τελικού όγκου 50 μ l), αναμιγνύονται:

- μήτρα DNA 1 μ l
- ορθόδρομος εκκινητής (300 ng/ μ l) 1 μ l
- οπισθόδρομος εκκινητής (300 ng/ μ l) 1 μ l
- dNTPs (10 mM, το κάθε ένα) 1 μ l
- Taq DNA πολυμεράση 1 μ l (1 unit/ μ l)
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα 5 μ l
- ddH₂O 40 μ l

Η αλληλουχία που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή του γονιδίου της *AnPPIB* (YP_002799514), ενισχύθηκε από το γενωματικό DNA του *A. vinelandii* με την μέθοδο της PCR. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν εκκινητές που περιέχουν θέσεις για τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Xho*I. Τα ενισχυμένα κλάσματα εισήχθησαν μεταξύ των αντίστοιχων θέσεων στον φορέα. Η απουσία ανεπιθύμητων μεταλλαγών επιβεβαιώθηκε με νουκλεοτιδική αλληλούχιση.

Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης *AnPPIB* (YP_002799514) είναι:

MIKLQTNHGTITLKL FADKAPETAANFEQYVKDGHYDGTIFHRVIDGFMIQGGGF
EPGMKQKSTRAPIKNEANGLSNKKYTIAMARTPDPHSASAQFFINVKDNAFLD
HTAPTAHGWGYAVFGEVVEGTDVVDRIKSVATGSRAGHGDVPVDDVIEKAEIV
E

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια να αντιστοιχούν στις θέσεις των *Bam*HI και *Xho*I, αντίστοιχα):

AnPPIB-F: 5'-AAAGGATCCATCAAGCTGCAAACCAACCACG-3' και

AnPPIB-R: 5'-AAACTCGAGTTATTCGACGATCTCGGCCTTC-3'

Έτσι, προέκυψε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *AnCyPA* με μέγεθος 21242 Da και αμινοξική ακολουθία:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSIKLQTNHGTITLKL FADK
APETAANFEQYVKDGHYDGTIFHRVIDGFMIQGGGFEPGMKQKSTRAPIKNEAN

NGLSNKKYTIAMARTPDPHSASAQFFINVKDNAFLDHTAPTAHGWGYAVFGEV
VEGTDVVDRIKSVATGSRAGHGDVPVDDVIIIEKAEIVE.

Τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αντιστοιχούν στον επίτοπο που συμπεριλαμβάνει τις έξι ιστιδίνες. Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη φέρει μια μεταλλαγή της Met1 σε Ser.

3.1.4. Κατευθυνόμενη σημειακή μετάλλαξη της *AnCyPA*

Τα μεταλλάγματα *AnCyPA*_{A84T}, *AnCyPA*_{A84S} και *AnCyPA*_{M49A} δημιουργήθηκαν με κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξίγνεση. Προς τούτο χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCDFDuet (σχήμα 3.2.), που υποβάλλεται σε πέψη με τα επιθυμητά ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Not*I.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια να αντιστοιχούν στις θέσεις των *Bam*HI και *Not*I, αντίστοιχα):

AnPPIB-F: 5'-AAAGGATCCAATCAAGCTGCAAACCAACCACG-3' και

AnPPIB-R: 5'-AAAGCGGCCGCTTATTCGACGATCTCGGCCTTC-3'

Επιπροσθέτως, οι εσωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

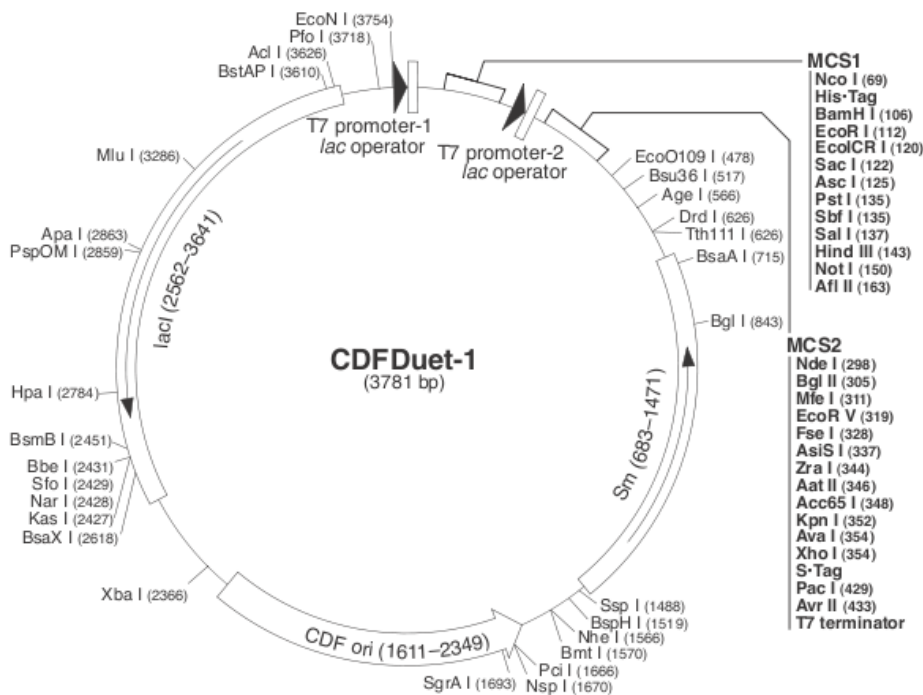
A84T-F	5'-CAAAAAATACACCATTACCATGGCGCGCACGCCCG-3'
A84T-R	5'-CGGGCGTGCGCGCCATGGTAATGGTGTATTTTTTG-3'
A84S-F	5'-CAAAAAATACACCATTTCATGGCGCGCACGCCCG-3'
A84S-R	5'-CGGGCGTGCGCGCCATGGAAATGGTGTATTTTTTG-3'
M49A-F	5'-GTGATCGACGGCTTCGCGATCCAGGGCGGCGGT-3'
M49A-R	5'-ACCGCCGCCCTGGATCGCGAAGCCGTCGATCAC-3'

Για τη δημιουργία του *AnCyPA*_{A84T} μεταλλάγματος, τα αρχικά προϊόντα της PCR, που προέκυψαν με τη χρήση των εκκινητών *AnPPIB-F/A84T-R* και *A84T-F/AnPPIB-R* καθαρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες για ένα δεύτερο PCR με τους *AnPPIB-F/AnPPIB-R* εκκινητές. Το τελικό προϊόν υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Not*I προκειμένου να εισαχθεί στο φορέα έκφρασης pCDFDuet. Η απουσία ανεπιθύμητων μεταλλαγών επιβεβαιώθηκε με νουκλεοτιδική αλληλούχιση. Με τον ίδιο τρόπο δημιουργήθηκαν τα *AnCyPA*_{A84S} και *AnCyPA*_{M49A} μεταλλάγματα.

Έτσι, προέκυψαν τα μεταλλάγματα της AnCyPA με μέγεθος 19311 Da και αμινοξική ακολουθία:

MGSSHHHHHHSQDPIKLQTNHGTITLKL FADKAPETAANFEQYVKDGHYDGTIF
 HRVIDGFMIQGGGFEPGMKQKSTRAPIKNEANGLSNKKYTIAMARTPDPHSAS
 AQFFINVKDNAFLDHTAPRTAHGWGYAVFGEVVEGTDVVDRIKSVATGSRAGHG
 DVPVDDVHIEKAEIVE.

Τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αντιστοιχούν στον 6xHIS επίτοπο και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες φέρουν επιπλέον μια μεταλλαγή της Met1 σε Pro. Τα κατάλοιπα της Met49 και Ala84 που μεταλλάχθηκαν σε Ala49, Ser84 και Thr84 σημειώνονται με έντονο χρώμα.



Σχήμα 3.2. Ο πλασμιδιακός χάρτης pCDFDuet-1 του φορέα μετασηματισμού κυττάρων *E. coli*

3.1.5. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Eschericia coli*

Προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων

- 10 ml LB θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος DH5a ή XL-blue) και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml θρεπτικού υλικού LB.
- Η καλλιέργεια επωάζεται με ανακίνηση στους 37°C μέχρι OD₆₀₀=0,3-0,4.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 σ.α.λ για 10 λεπτά, στους 4°C. Όλοι οι χειρισμοί που ακολουθούν γίνονται μέσα σε πάγο.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται ήπια σε 25ml 0.1 M MgCl₂. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 σ.α.λ.
- Τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρούνται σε 25 ml 0.1 M CaCl₂ και διατηρούνται σε πάγο για 20 λεπτά. Φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 6.000 σ.α.λ.
- Τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml 0.1 M CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v). Τα κύτταρα αφού μοιραστούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων

- Περίπου 10-100 ng απομονωμένου πλασμιδιακού DNA αναμιγνύονται με 100 μl ικανών κυττάρων και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Το μίγμα υποβάλλεται σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό. Αφού προστεθούν 200μl θρεπτικού διαλύματος LB, το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα.

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με την εφαρμογή και τον πλασμιδιακό φορέα.

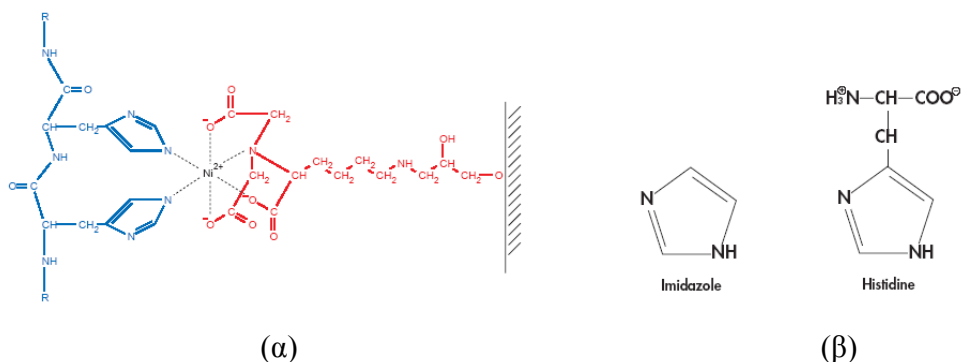
Στην παρούσα διατριβή, κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) μετασηματίστηκαν με τους φορείς pET28a και pCDFDuet-1 και η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, που φέρουν τον 6xHIS επίτοπο, επάχθηκε με την προσθήκη στην κυτταρική καλλιέργεια 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG), όταν η τιμή της οπτικής πυκνότητας στα OD₆₀₀ έφτασε την τιμή 0.6. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και τα κυτταρικά τοιχώματα διερρήχθησαν με την χρήση υπερήχων σε διάλυμα λύσης (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο σε συνδυασμό με 1mg/ml λυσοζύμη).

3.1.6. Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας

Χρωματογραφία συγγένειας

Στη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC), ως προσδέτες χρησιμοποιούνται ιόντα μετάλλων. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του αμινοξέος ιστιδίνης να δρα ως δότης ηλεκτρονίων και να προσδένει δισθενή μεταλλικά ιόντα (Ni⁺² και Cu⁺²). Έτσι, πραγματοποιείται προσθήκη μιας ουράς διαδοχικών ιστιδινών (6-10) στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης προκειμένου να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή συγγένεια με τα ιόντα μετάλλου. Τα τελευταία είναι προσδεμένα στη χημική ομάδα NTA (Nitrilotriacetic acid) (σχήμα 3.3.α), που υπάρχει στην στήλη. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται κατάλληλα διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (σχήμα 3.3.β), το οποίο ανταγωνίζεται την πρόσδεση των ιστιδινών στο νικέλιο.

Ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη νικελίου (Ni²⁺-nitrilotriacetate, Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κλάσματα της εκλούμενης πρωτεΐνης συγκεντρώθηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο Bradford και ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα με 35mM Hepes pH 8.0, 70mM NaCl, για 12h.



Σχήμα 3.3.α. Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων ιστιδίνης του 6xHIS επιτόπου της πρωτεΐνης και της ομάδας Ni-NTA της μήτρας β. Η χημική δομή της ιστιδίνης και του ιμιδαζολίου

Καθαρισμός των πρωτεϊνών που φέρουν τον His επίτοπο (6xHIS tag)

- 1) Τοποθέτηση των κυττάρων στον πάγο για 15'. Προσθήκη 2-5ml από το διάλυμα λύσης ανά γραμμάριο υγρής μάζας.
- 2) Προσθήκη λυσοζύμης σε 1mg/ml και επώαση σε πάγο για 30'.
- 3) Διάρρηξη κυττάρων με χρήση υπερήχων σε πάγο (10 παλμοί στα 200-300W με 10" ενδιάμεση περίοδο για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του οργάνου).
- 4) (Προαιρετικό) Αν το διάλυμα έχει μεγάλο ιξώδες προστέονται 10μg/ml RNAase A και 5μg/ml DNAase I. Επώαση σε πάγο για 10-15'.
- 5) Φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος στα 10.000 σ.α.λ. για 20-30' στους 4°C.
- 6) Προσθήκη 1ml 50% Ni-NTA χρωματογραφικού υλικού σε 4ml καθαρού εκχυλίσματος και ήπια ανάμιξη με ανακίνηση (200σ.α.λ. σε αναδευτήρα) στους 4°C για 1h.
- 7) Πλύσιμο με 4ml διάλυμα έκπλυσης και συλλογή κλασμάτων για SDS-PAGE.
- 8) Έκλυση της πρωτεΐνης 4 φορές με 0.5ml διάλυμα έκλυσης.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ (LYSIS BUFFER)

(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο)

ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ (WASH BUFFER)

(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο)

ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (ELUTION BUFFER)

(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM ιμιδαζόλιο)

ΠΛΥΣΗ ΚΟΛΩΝΑΣ

20ml dH₂O, 0.5M NaOH για 30min, 30ml dH₂O, 30% EtOH

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PPIASE (ASSAY BUFFER)

(50mM Hepes, 100mM NaCl pH:8.0 με NaOH)

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΠΗΔΗΣΗΣ (DIALYSIS BUFFER)

0.7l από ASSAY BUFFER σε 1l

ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (ACRYLAMIDE GELS)

<u>Main gel</u>	<u>15% gel(ml)</u>	<u>stocking gel(ml)</u>
dH ₂ O	8	6.24
Ακρυλαμίδη 30%	15	1.3
Bis 1%	2.6	1
3M Tris pH:8.6	3.75	-
1M Tris pH:6.8	-	1.25
SDS 10%	0.3	0.1
TEMED	15μl	15μl
APS 10%	150 μl	150 μl

RUNNING BUFFER (10x) pH:8.0

(Γλυκίνη 144g, Tris base 30g, SDS 10g)

Ανάλυση δείγματος πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

- Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης αναμειγνύονται τα συστατικά που αναγράφονται στον πίνακα 3.1. Το TEMED και το APS προστίθενται ταυτόχρονα και τελευταία. Η συγκέντρωση των συστατικών της πηκτής πολυακρυλαμίδης επιλέγεται ανάλογα με το μέγεθος των υπό μελέτη πρωτεϊνών και του επιθυμητού εύρους διαχωρισμού.
- Το μίγμα των συστατικών του κυρίως τμήματος της πηκτής, τοποθετείται στην ειδική κατασκευή δημιουργίας πηκτής για ηλεκτροφόρηση κάθετου τύπου.

- Προστίθεται μικρή ποσότητα νερού για τη δημιουργία οριζόντιας ελεύθερης επιφάνειας.
- Μετά τον πολυμερισμό του κυρίως τμήματος της πηκτής προστίθεται το μίγμα της πηκτής επικάλυψης και τοποθετείται το εξάρτημα για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης.
 - Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής επικάλυψης η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει τοποθετηθεί και 1X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
 - Τα δείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνται στις θέσεις φόρτωσης και αναλύονται με εφαρμογή τάσης 90 Volts, όσο παραμένουν στην πηκτή επικάλυψης και 140 Volts στη συνέχεια.
 - » διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 144 g/l γλυκίνη, 30.25 g/l Tris, 10 g/l SDS

Πίνακας 3.1. Συστατικά παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμιδίου

	Κυρίως σώμα πηκτής							Π. επικάλυψης
	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%	25%	4%
30% ακρυλ.αμ.	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml	17,5 ml	20 ml	25 ml	1,30 ml
1% bis-ακρυλ.αμ.	5,2 ml	3,90 ml	3,10 ml	2,60 ml	2,20 ml	1,90 ml	1,50 ml	1,00 ml
3 M Tris pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	-	-	-	-	-	1,25 ml
10% SDS	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,10 ml
dH ₂ O	13,09ml	11,9 ml	10,19ml	8,19 ml	6,09 ml	3,84 ml	-	6,24 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
10% APS	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,01 ml

Χρόση με Coomassie Brilliant Blue R250

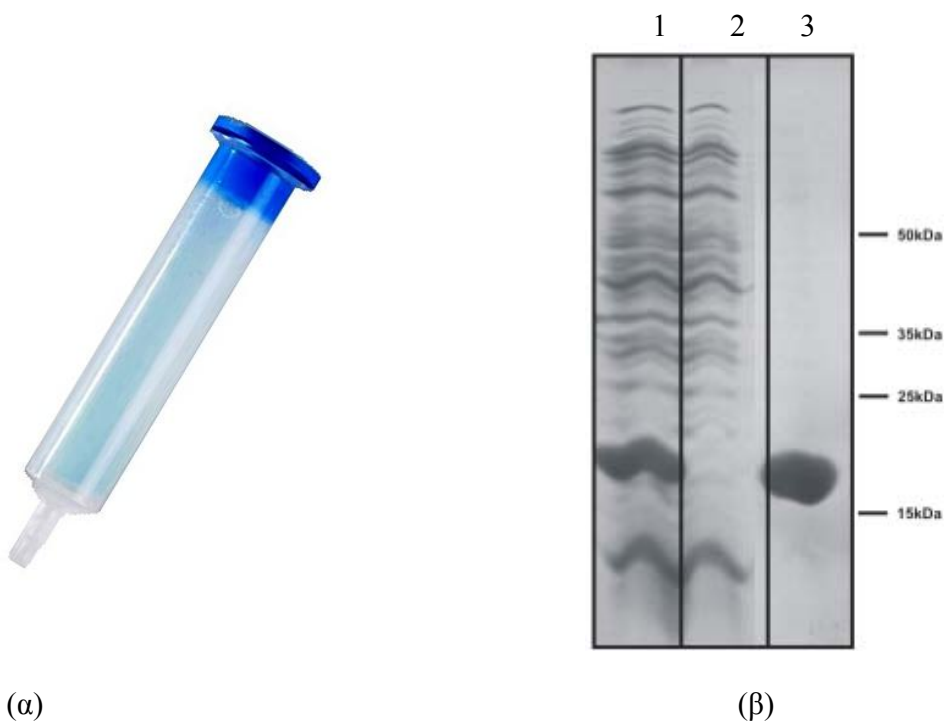
- Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης στους 60°C για 30 λεπτά.

Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε 2 ώρες το διάλυμα αντικαθίσταται με νέο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αποχρωματισθεί ικανοποιητικά η πηκτή (σχήμα 3.4.β).

» διάλυμα χρώσης: 450 ml/l μεθανόλη, 100 ml/l οξικό οξύ, 0.25 g/l Coomassie Brilliant Blue

» διάλυμα αποχρωματισμού: 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ

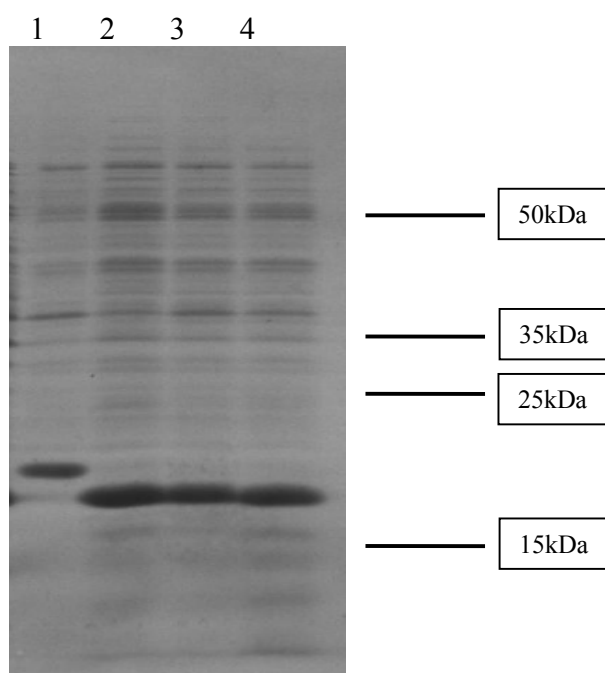
Η καθαρισμένη πρωτεΐνη, που περιείχε τον 6xHIS επίτοπο και μια μεταλλαγή της Met1 σε Ser, ήταν πάνω από 95% καθαρή βάση της SDS ηλεκτροφόρησης.



Σχήμα 3.4.α. Στήλη νικελίου για χρωματογραφία συγγένειας, **β.** SDS-PAGE ανάλυση του διαλυτού κυτταροπλασματικού κλάσματος από κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) στα οποία υπερεκφράστηκε η *A* PPIB (θέση 1), του κλάσματος έκπλυσης μετά από καθαρισμό με χρήση στήλης Ni-NTA (θέση 2) και του κλάσματος έκπλυσης μετά από καθαρισμό με χρήση στήλης Ni-NTA της ανασυνδυασμένης *Av*PPIB (θέση 3).

3.2. Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων στην ενεργότητα του ενζύμου

Η έκφραση και καθαρισμός της φυσικής και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών έγινε όπως περιγράφεται παραπάνω. Στο σχήμα 3.5. φαίνεται η SDS-PAGE ανάλυση του κλάσματος έκλουσης των τεσσάρων πρωτεϊνών.

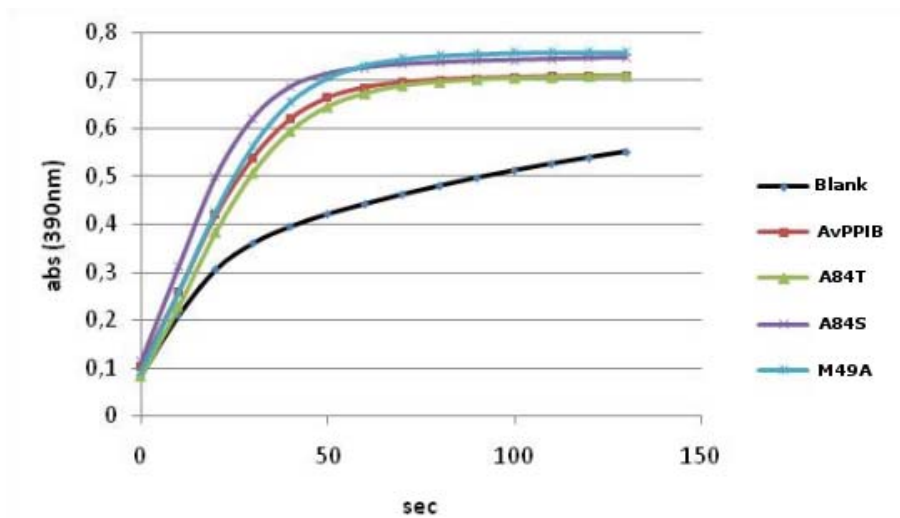


Σχήμα 3.5. SDS-PAGE ανάλυση του κλάσματος έκλουσης μετά από καθαρισμό με χρήση στήλης Ni-NTA της φυσικής ανασυνδυασμένης *AnCyPA* (θέση 1), του μεταλλάγματος *AnCyPA_{A84T}* (θέση 2), *AnCyPA_{A84S}* (θέση 3) και *AnCyPA_{M49A}* (θέση 4).

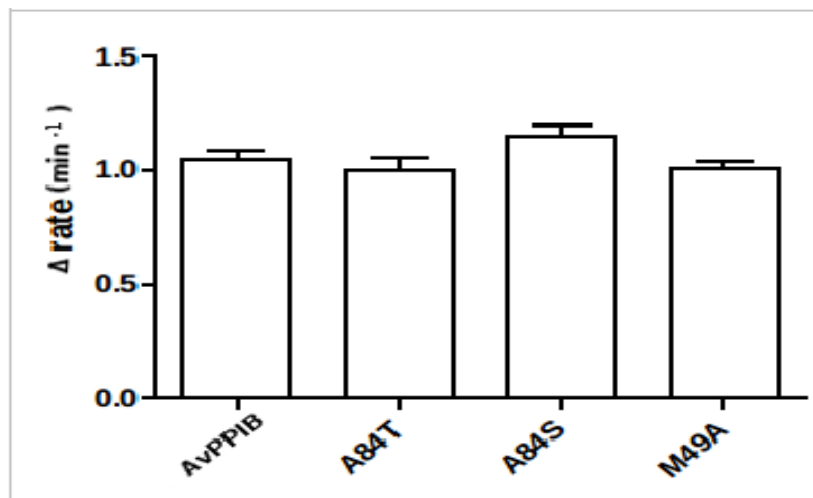
Η δράση ισομεράσης προλίνης του ενζύμου της *AnCyPA* έχει ήδη μελετηθεί με πειράματα κινητικής μελέτης (Dimou et al., 2011).

Προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα ισομεράσης των μεταλλαγμάτων, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (His)₆-*AnCyPA* και τα μεταλλάγματα προετοιμάστηκαν, όπως αναφέρθηκε προτύτερα. Η δράση ισομεράσης μελετήθηκε με την χρήση πειραμάτων βασισμένων στη χυσοθρυψίνη, η οποία επιλεκτικά αναγνωρίζει και υδρολύει την *trans* διαμόρφωση του Xaa-Pro πεπτιδικού δεσμού του συνθετικού

πεπτιδίου suc-AXaaPF-pNA (Bachem). Παρουσία πεπτιδυλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης, ο Xaa-Pro πεπτιδικός δεσμός μετατρέπεται ταχύτερα στην *trans* διαμόρφωση, η οποία στη συνέχεια υδρολύεται από την α -χυμοτριψίνη, οδηγώντας στο σχηματισμό της 4-nitroaniline, η συσσώρευση της οποίας μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά (σχήμα 3.6.α). Το μίγμα για την αντίδραση περιέχει 50mM HEPES (pH 8.0) και 100mM NaCl, 50μg α -χυμοτριψίνη (διαλυμένη σε 1mM HCl, Fluka), 25μM suc-AAPF-pNA (5mM stock διαλυμένο σε TFE μαζί με 0.45M LiCl), και την απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου. Το ρυθμιστικό διάλυμα αναμείχθηκε με α -χυμοθρυψίνη και ακολούθως με το ένζυμο. Η αντίδραση άρχισε μέσα στην κυβέτα με την προσθήκη πεπτιδίου και η αύξηση της απορρόφησης στα 390nm καταγράφηκε στους 4°C με τη χρήση φασματοφωτόμετρου HITACHI U-2800 εξοπλισμένου με θερμορυθμιστή. Στο σχήμα 3.6.β. παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του ρυθμού ισομερίωσης για την καταλυόμενη και τη μη καταλυόμενη αντίδραση, για κάθε μια πρωτεΐνη.



(α)



(β)

Σχήμα 3.6. Ενδεικτικές πορείες αντίδρασης ισομερίωσης του πεπτιδίου suc-AAPF-pNA απουσία και παρουσία της φυσικής AvPPIB και των μεταλλαγμάτων AvCyPA_{A84T}, AvCyPA_{A84S} και AvCyPA_{M49A}. Παρουσία πεπτιδυλ-πρόλλυλ *cis/trans* ισομεράσης, ο Xaa-Pro πεπτιδικός δεσμός μετατρέπεται ταχύτερα στην *trans* διαμόρφωση, η οποία στη συνέχεια υδρολύεται από την α-χυμοθρυψίνη, οδηγώντας στο σχηματισμό της 4-nitroaniline, η συσσώρευση της οποίας μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά στα 390nm. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών επαναλήψεων για κάθε περίπτωση. β. Η ενεργότητα ισομεράσης της φυσικής AvPPIB και των μεταλλαγμάτων AvCyPA_{A84T}, AvCyPA_{A84S} και AvCyPA_{M49A}, σε συγκέντρωση 5 nM, εκφρασμένη ως η διαφορά του ρυθμού ισομερίωσης για την καταλυόμενη και τη μη καταλυόμενη αντίδραση, για κάθε μια πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιστοιχούν στα τυπικά σφάλματα.

3.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη της Κυκλοφιλίνης-A

3.3.1. Κρυστάλλωση της κυκλοφιλίνης-A

Η αρχική σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας έγινε με την χρήση του εμπορικού Crystallization Basic kit 82009 (Sigma). Το συγκεκριμένο kit περιέχει ως παράγοντες κατακρήμνισης, κυρίως, πολυαιθυλενογλυκόλη σε διάφορους βαθμούς πολυμερισμού (PEG 400, PEG 2K, PEG 4K και PEG 8K). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 8 mg/ml σε διάλυμα 35 mM HEPES pH 8.0, 70 mM NaCl. Οι συνθήκες του εμπορικού kit που απέδωσαν ήταν οι υπ' αριθμόν #3, #6, #18, #19, #22, #28, #41 και #43, όπως δείχνει ο πίνακας 3.2. Οι καλύτεροι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν στην συνθήκη #41, αλλά είχαν σχήμα βελονοειδές και μικρό μέγεθος που τους καθιστούσαν μη αξιοποιήσιμους για συλλογή δεδομένων (Σχήμα 3.7.α).

Πίνακας 3.2. Η σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης με το εμπορικό kit της εταιρίας Sigma

No.	Χημική σύνθεση διαλυμάτων σάρωσης	Αποτελέσματα	
		AvCyPA	AvCyPA/AFPF
1.	CaCl ₂ 0.02M, CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, MPD 30%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
2.	⁺ K ⁻ O-CO-CH(OH)-CH(OH)-CO-O ⁻ Na ⁺ 0.4M	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
3.	(NH ₄) ₂ PO ₄ 0.4M	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
4.	Tris-HCl (pH 8.5) 0.1M, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.0M	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
5.	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Na}^+\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \\ \\ \text{COO}^-\text{Na}^+ \end{array}$ 0.2M, HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, MPD 30%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
6.	MgCl ₂ 0.2M, Tris-HCl (pH 8.5) 0.1M, PEG 4000 30%	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
7.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{NaO}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ (pH 6.5) 0.1M, CH ₃ COONa 1.4M	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης

8.	$\text{Na}^+\text{OOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{COO}^-\text{Na}^+}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \quad 0.2\text{M},$ $\text{NaO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{As}}-\text{CH}_3 \quad (\text{pH } 6.5) \quad 0.1\text{M},$ CH_3 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \quad 30\%$	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
9.	$\text{CH}_3\text{COONH}_4 \quad 0.2\text{M},$ $\text{Na}^+\text{OOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{COO}^-\text{Na}^+}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \quad (\text{pH } 5.6) \quad 0.1\text{M},$ $\text{PEG } 4000 \quad 30\%$	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
10.	$\text{CH}_3\text{COONH}_4 \quad 0.2\text{M}, \text{CH}_3\text{COONa} \quad (\text{pH } 4.6) \quad 0.1\text{M},$ $\text{PEG } 4000 \quad 30\%$	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
11.	$\text{Na}^+\text{OOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{COO}^-\text{Na}^+}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \quad (\text{pH } 5.6) \quad 0.1\text{M},$ $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4 \quad 1.0\text{M}$	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
12.	$\text{MgCl}_2 \quad 0.2\text{M}, \text{HEPES Na-salt} \quad (\text{pH } 7.5) \quad 0.1\text{M},$ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \quad 30\%$	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
13.	$\text{Na}^+\text{OOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{COO}^-\text{Na}^+}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \quad 0.2\text{M},$ $\text{Tris-HCl} \quad (\text{pH } 8.5) \quad 0.1\text{M}, \text{PEG } 400 \quad 30\%$	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
14.	$\text{CaCl}_2 \quad 0.2\text{M}, \text{HEPES Na-salt} \quad (\text{pH } 7.5) \quad 0.1\text{M}, \text{PEG } 400 \quad 28\%$	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
15.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \quad 0.2\text{M},$ $\text{NaO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{As}}-\text{CH}_3 \quad (\text{pH } 6.5) \quad 0.1\text{M},$ CH_3 $\text{PEG } 8000 \quad 30\%$	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
16.	$\text{HEPES Na-salt} \quad (\text{pH } 7.5) \quad 0.1\text{M}, \text{Li}_2\text{SO}_4 \quad 1.5\text{M}$	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
17.	$\text{Li}_2\text{SO}_4 \quad 0.2\text{M}, \text{TRIS-HCl} \quad (\text{pH } 8.5) \quad 0.1\text{M}, \text{PEG } 4000 \quad 30\%$	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
18.	$(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Mg} \quad 0.2\text{M},$	Σχηματισμός βελονοειδών	Σχηματισμός βελονοειδών

	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{NaO-As-CH}_3 \text{ (pH 6.5) 0.1M,} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{PEG 8000 20\%} \end{array}$	κρυστάλλων	κρυστάλλων
19.	CH ₃ COONH ₄ 0.2M, Tris-HCl (pH 8.5) 0.1M, CH ₃ CH(OH)CH ₃ 30%	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
20.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2M, CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, PEG 4000 25%	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
21.	(CH ₃ COO) ₂ Mg 0.2M, CH ₃ COONa (pH 6.5) 0.1M, MPD 30%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
22.	CH ₃ COONa 0.2M, TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M, PEG 4000 30%	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
23.	MgCl ₂ 0.2M, HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, PEG 400 30%	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
24.	CaCl ₂ 0.2M, CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, CH ₃ CH(OH)CH ₃ 20%	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
25.	Ιμιδαζόλιο (pH 6.5) 0.1M, CH ₃ COONa 1M	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
26.	CH ₃ COONH ₄ 0.2M, $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Na}^+\text{OOC-CH}_2\text{-C-C H}_2\text{-COO}^-\text{Na}^+ \text{ (pH 5.6) 0.1M,} \\ \\ \text{COO}^-\text{Na}^+ \end{array}$ MPD 30%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
27.	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Na}^+\text{OOC-CH}_2\text{-C-C H}_2\text{-COO}^-\text{Na}^+ \text{ 0.2M,} \\ \\ \text{COO}^-\text{Na}^+ \end{array}$ HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, CH ₃ CH(OH)CH ₃ 20%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
28.	CH ₃ COONa 0.2M, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{NaO-As-CH}_3 \text{ (pH 6.5) 0.1M,} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{PEG 8000 30\%} \end{array}$	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
29.	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, ⁺ K ⁻ OCO-CH(OH)-CH(OH)-COO ⁻ Na ⁺ 0.8M	Ισχυρή καθίζηση	Ισχυρή καθίζηση

		πρωτεΐνης	πρωτεΐνης
30.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2M, PEG 8000 30%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
31.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2M, PEG 4000 30%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
32.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2M	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
33.	HCOONa 4M	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
34.	CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, HCOONa 2M	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
35.	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, KH ₂ PO ₄ 0.8M, NaH ₂ PO ₄ 0.8M	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
36.	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M, PEG 8000 8%	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
37.	CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, PEG 4000 8%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
38.	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Na}^+ \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C} \text{H}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \\ \\ \text{COO}^-\text{Na}^+ \end{array} \quad 1.4\text{M}$	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
39.	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, PEG 400 2%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.0M	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
40.	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Na}^+ \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C} \text{H}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+ \\ \\ \text{COO}^-\text{Na}^+ \end{array} \quad (\text{pH } 5.6) \text{ 0.1M,}$ CH ₃ CH(OH)CH ₃ 20%, PEG 4000 20%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
41.	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M, CH ₃ CH(OH)CH ₃ 10%, PEG 4000 20%	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
42.	KH ₂ PO ₄ 0.05M, PEG 8000 20%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
43.	PEG 1500 30%	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων	Σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων
44.	(HCOO) ₂ Mg 0.2M	Η πρωτεΐνη	Η πρωτεΐνη

		παρέμεινε διαλυτή	παρέμεινε διαλυτή
45.	(CH ₃ COO) ₂ Zn 0.2M, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{NaO-As-CH}_3 \end{array}$ (pH 6.5) 0.1M, $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ PEG 8000 18%	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
46.	(CH ₃ COO) ₂ Ca 0.2M, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{NaO-As-CH}_3 \end{array}$ (pH 6.5) 0.1M, $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ PEG 8000 18%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
47.	CH ₃ COONa (pH 4.6) 0.1M, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.0M	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης	Ισχυρή καθίζηση πρωτεΐνης
48.	Tris-HCl (pH 8.5) 0.1M, (NH ₄) ₂ PO ₄ 2.0M	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης
49.	Li ₂ SO ₄ 1.0M, PEG 8000 2%	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή	Η πρωτεΐνη παρέμεινε διαλυτή
50.	Li ₂ SO ₄ 0.5M, PEG 8000 15%	Καθίζηση πρωτεΐνης	Καθίζηση πρωτεΐνης

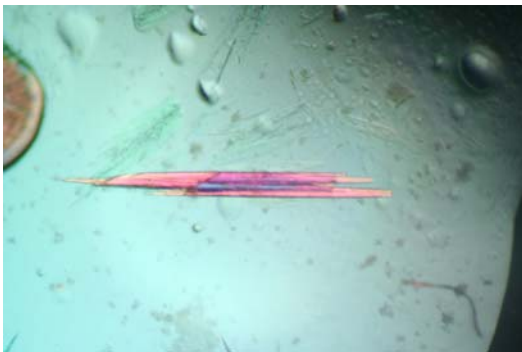
Έτσι, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια βελτιστοποίησης της συνθήκης #41. Με μια σειρά δισδιάστατων πειραμάτων, αναζητήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση κατακρημνιστή, το βέλτιστο pH του διαλύματος HEPES και η βέλτιστη συγκέντρωση της 2-προπανόλης για σχηματισμό μονοκρυστάλλου. Ωστόσο, οι νέοι κρύσταλλοι παρέμεναν μικροί σε μέγεθος, ήταν ιδιαιτέρως εύθραστοι σε μηχανικές καταπονήσεις και συνεπώς μη αξιοποιήσιμοι για συλλογή δεδομένων.

Συνεπώς, το επόμενο βήμα περιλάμβανε απομάκρυνση της περιοχής ιστιδινών (6xHIS) της πρωτεΐνης με πρωτεόλυση. Προς τούτο, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της θρομβίνης. Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη επώαστηκε με θρομβίνη για 24h στους 4°C, με αποτέλεσμα να απομακρύνει η θρομβίνη το 6xHIS επίτοπο της πρωτεΐνης. Το διάλυμα φορτώθηκε σε κολώνα Ni-NTA ξανά, προκειμένου να δεσμευτεί το 6xHIS επίτοπο σε αυτήν. Το διάλυμα έκπλυσης, που περιείχε τόσο την καθαρισμένη πρωτεΐνη, όσο και το ένζυμο της θρομβίνης φορτώθηκε ξανά σε κολώνα p-aminobenzamidine, προκειμένου να

δεσμευτεί το ένζυμο της θρομβίνης. Το τελικό στάδιο, περιλαμβάνει διαπήδηση στο διάλυμα διατήρησης 35 mM HEPES pH 8.0, 70 mM NaCl.

Νέες προσπάθειες βελτιστοποίησης, χρησιμοποιώντας την καθαρισμένη από το 6xHIS επίτοπο πρωτεΐνη τελικά απέδωσαν, δίνοντας ραβδόμορφους και αξιοποιήσιμους κρυσταλλογραφικά κρυστάλλους (Σχήμα 3.7.β).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Προετοιμάστηκαν σταγόνες με ανάμιξη 1.5μl πρωτεϊνικού διαλύματος και 1.5μl διαλύματος καθίζησης (22% (w/v) πολυαιθυλενική γλυκόλη 4000, 10% 2-προπανόλη, 0.1 M HEPES pH 7.5) και εκτέθηκαν πάνω από πηγάδια που περιείχαν 1 ml από το τελευταίο. Οι σταγόνες αρχικά θόλωσαν, αλλά ξανάγιναν διαυγείς την επομένη. Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν στους 18°C μέσα σε δυο εβδομάδες.



Σχήμα 3.7.α. Βελονοειδείς (μη αξιοποιήσιμοι) κρύσταλλοι του ενζύμου της ελεύθερης AvCyPA με το 6xHIS επίτοπο, που αναπτύχθηκαν με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας και **β.** Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι, που χρησιμοποιήθηκαν για συλλογή δεδομένων με ακτινοβολία σύγχροτρον του ενζύμου της ελεύθερης AvCyPA χωρίς τον 6xHIS επίτοπο, που αναπτύχθηκαν με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Χρήση εμπορικού kit (Sigma).

Τα παρακάτω διαλύματα (Πίνακας 3.3) εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύσουν τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης κατά την ψύξη με άζωτο. Τελικά, το καλύτερο κρυοπροστατευτικό διάλυμα για τους κρυστάλλους αποδείχθηκε πως ήταν το 20% PEG 400 σε μητρικό διάλυμα.

Πίνακας 3.3. Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για κρυστάλλους *AnCyPA*

20% PEG400	20% Γλυκερόλη
30% PEG400	30% Γλυκερόλη
40% PEG400	40% Γλυκερόλη

3.3.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων μονοκρυστάλλου της ελεύθερης μορφής της Κυκλοφιλίνης A

Ένας κρύσταλλος της ελεύθερης μορφής της πρωτεΐνης με τυπικό μέγεθος 0.6 mm x 0.2 mm x 0.2 mm χρησιμοποιήθηκε για συλλογή δεδομένων με χρήση Mar CCD ως ανιχνευτή στην γραμμή ακτινοβολήσης X13 του EMBL (DORIS storage ring, DESY, Αμβούργο). Ο κρύσταλλος, αφού μεταφέρθηκε σε διάλυμα κρυοπροστασίας, που περιείχε 20% PEG 400, 22% (w/v) πολυαιθυλενογλυκόλη 4000, 10% 2-προπανόλη και 0.1 M HEPES pH 7.5, τοποθετήθηκε αστραπιαία σε ρεύμα N₂ προκειμένου να ξεκινήσει η συλλογή δεδομένων στους 100 K.

Τα δεδομένα περίθλασης για την δομή της ελεύθερης *AnCyPA* σε ανάλυση 2.2 Å συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με το υπολογιστικό πακέτο HKL2000. Τα δεδομένα υπέδειξαν κατά την δεικτοδότηση (Denzo) πως το κρυσταλλικό πλέγμα είναι μονοκλινές (P) (σχήμα 3.8.α.). Παράλληλα, οι συστηματικές αποσβέσεις (σχήμα 3.8.β.) μετά την κανονικοποίηση και συγχώνευση δεδομένων (Scalepack) κατέστησε την ομάδα χώρου *P2₁* ως την πιο πιθανή για την εύρεση λύσης της δομής. Ο υπολογισμός του συντελεστή Matthews (Kantardjiev & Rupp, 2003) (2.10 Å³Da⁻¹) υπέδειξε τέσσερα μόρια του ενζύμου να απαρτίζουν την ασύμμετρη μονάδα και 41.45% ποσοστό διαλύτη.

primitive cubic	4.72%	79.02 70.78	66.38 70.78	66.95 70.78	90.28 90.00	90.06 90.00	92.06 90.00
I centred cubic	20.49%	103.51 99.64	101.36 99.64	94.05 99.64	63.92 90.00	64.01 90.00	54.94 90.00
F centred cubic	20.55%	121.25 122.45	121.70 122.45	124.41 122.45	65.28 90.00	80.07 90.00	113.10 90.00
primitive rhombohedral	4.68%	79.02 70.78 104.32	66.38 70.78 104.32	66.95 70.78 121.25	90.28 90.80 90.00	90.06 90.80 90.00	92.06 90.80 120.00
primitive hexagonal	13.45%	79.02 72.70	66.38 72.70	66.95 66.95	90.28 90.00	90.06 90.00	92.06 120.00
primitive tetragonal	0.88%	66.38 66.67	66.95 66.67	79.02 79.02	90.06 90.00	92.06 90.00	90.28 90.00
I centred tetragonal	13.45%	66.95 66.67	66.38 66.67	181.78 181.78	70.60 90.00	111.44 90.00	89.72 90.00
primitive orthorhombic	0.86%	66.38 66.38	66.95 66.95	79.02 79.02	90.06 90.00	92.06 90.00	90.28 90.00
C centred orthorhombic	0.87%	94.05 94.05	94.52 94.52	79.02 79.02	88.60 90.00	88.50 90.00	90.49 90.00
I centred orthorhombic	13.45%	66.38 66.38	66.95 66.95	181.78 181.78	68.56 90.00	109.40 90.00	89.72 90.00
F centred orthorhombic	13.43%	94.05 94.05	94.52 94.52	181.78 181.78	88.53 90.00	60.35 90.00	89.51 90.00
primitive monoclinic	0.12%	66.38 66.38	66.95 66.95	79.02 79.02	89.94 90.00	92.06 92.06	89.72 90.00
C centred monoclinic	0.62%	94.05 94.05	94.52 94.52	79.02 79.02	88.60 90.00	91.50 91.50	89.51 90.00

(α)

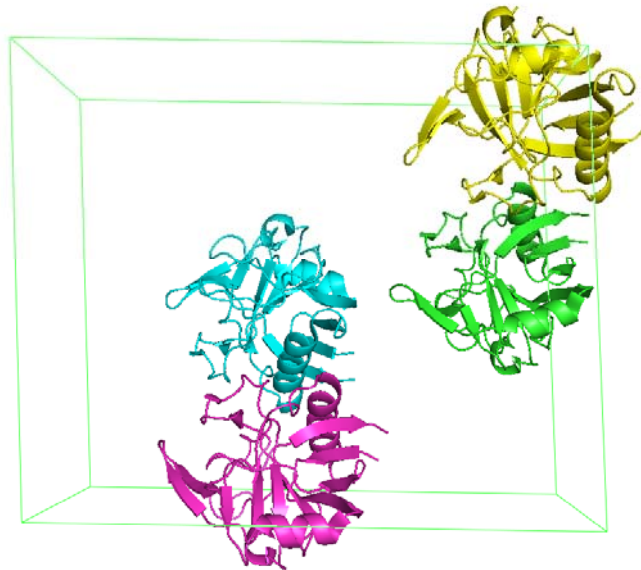
Intensities of systematic absences					
h	k	l	Intensity	Sigma	I/Sigma
0	5	0	-1.7	1.8	-1.0
0	7	0	2.1	4.0	0.5
0	9	0	-0.1	6.2	0.0
0	11	0	-0.5	7.2	-0.1
0	13	0	-4.0	8.2	-0.5
0	15	0	0.5	8.0	0.1
0	17	0	-4.2	10.9	-0.4
0	19	0	-3.4	14.7	-0.2
0	21	0	3.0	16.0	0.2
0	23	0	-4.7	14.3	-0.3
0	25	0	1.8	11.1	0.2
0	27	0	-7.7	14.0	-0.6
0	29	0	-8.7	17.3	-0.5
0	31	0	-1.6	16.9	-0.1
0	33	0	-18.3	18.5	-1.0

(β)

Σχήμα 3.8.α. Τα αποτελέσματα της δεικτοδότησης από το πρόγραμμα Denzo (HKL2000) υπέδειξαν μονοκλινές (P) κρυσταλλικό πλέγμα, **β.** οι συστηματικές αποσβέσεις μετά από επεξεργασία με το πρόγραμμα Scalepack (HKL2000) υπέδειξε ομάδα χώρου $P2_1$.

3.3.3. Καθορισμός της δομής της ελεύθερης μορφής της Κυκλοφιλίνης A

Η δομή της ελεύθερης μορφής της AnCyPA λύθηκε μοριακή αντικατάσταση και την χρήση των προγραμμάτων AmoRe και CNS. Η κρυσταλλική δομή του AnCyPA-AFPF συμπλόκου (βλέπε παρακάτω), με τα άτομα του πεπτιδίου και τα μόρια του νερού να έχουν απομακρυνθεί, χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο. Αρχικά, το πρόγραμμα AmoRe εντόπισε τέσσερις καλές λύσεις ($C(t)=0.40$ και $R=50\%$, περίπου για καθεμία λύση), που αντιστοιχούν στα τέσσερα μόρια (A, B, C και D) της ασύμμετρης μονάδας. Οπότε, το πρόβλημα μετατοπίστηκε στην εύρεση των σχετικών θέσεων των τεσσάρων ατόμων στην ασύμμετρη μονάδα. Προς τούτο, χρησιμοποιήθηκαν σχετικά προγράμματα του CNS για διερεύνηση συναρτήσεων περιστροφής (cross-rotation) και μετατόπισης (translation). Αρχικά, αφού ενοποιήθηκαν τα πρότυπα για τα μόρια A και B σε ένα αρχείο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο, η διερεύνηση συνάρτησης περιστροφής έδωσε δυο καλές λύσεις, δηλαδή δυο καλές θέσεις, για το μόριο B σε σχέση με το A. Ακολούθως, η εφαρμογή της συνάρτησης μετατόπισης για αυτές τις λύσεις «τοποθέτησε» το μόριο B στην τελική του θέση σε σχέση με το A. Το PC σκορ (monitor value) ήταν 0.44 και το ποσοστό της μοναδιαίας κυψελίδας που καλύφθηκε από το διμερές (packing value) ήταν 29.1%. Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την ενοποίηση των μορίων A, B (που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία) και C (μοντέλο που προέκυψε από το AmoRe) σε ένα κοινό αρχείο, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο σε νέα διερεύνηση συνάρτησης περιστροφής και μετατόπισης. Ο εντοπισμός της τελικής θέσης του μορίου C σε σχέση με τα A και B, βελτίωσε περαιτέρω τα στατιστικά της δομής (monitor value=0.64 και packing value=43.5%). Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τέταρτο μόριο D (monitor value=0.79 και packing value=57.9%). Έτσι, πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση των θέσεων και των τεσσάρων μορίων στην ασύμμετρη μονάδα (Σχήμα 3.9.).



Σχήμα 3.9. Η ασύμμετρη μονάδα της δομής του ελεύθερου ενζύμου αποτελείται από τέσσερα κρυσταλλογραφικώς ανεξάρτητα μόρια.

Το αρχικό μοντέλο, που περιείχε αυτά τα 4 μόρια μετά από άκαμπτου σώματος (rigid body) βελτιστοποίηση είχε συντελεστή συσχέτισης $C(t)$ ίσο με 0.79 και παράγοντα R ίσο με 32.3%. Το μοριακό μοντέλο ανοικοδομήθηκε με το πρόγραμμα COOT και βελτιστοποιήθηκε με το CNS. 10% των δεδομένων δεσμεύτηκαν για τον υπολογισμό του παράγοντα R_{free} . Στοιχεία μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας (NCS) εφαρμόστηκαν στην πλειοψηφία των αμινοξέων κατά την βελτιστοποίηση. Τα μόρια νερού εντοπίστηκαν με το COOT. Συνεχείς κύκλοι ανοικοδόμησης του μοντέλου και βελτιστοποίησης τόσο των θέσεων (Minimize) όσο και του παράγοντα B (Bindividual) των ατόμων του οδήγησαν σε ένα τελικό μοντέλο με δείκτες αξιοπιστίας $R=22.6\%$ και $R_{\text{free}}=27.4\%$. Πιο αναλυτικά, τα στάδια βελτιστοποίησης της δομής δίνονται στον πίνακα 3.4:

Πίνακας 3.4. Τα στάδια βελτιστοποίησης της δομής της AnCyPA

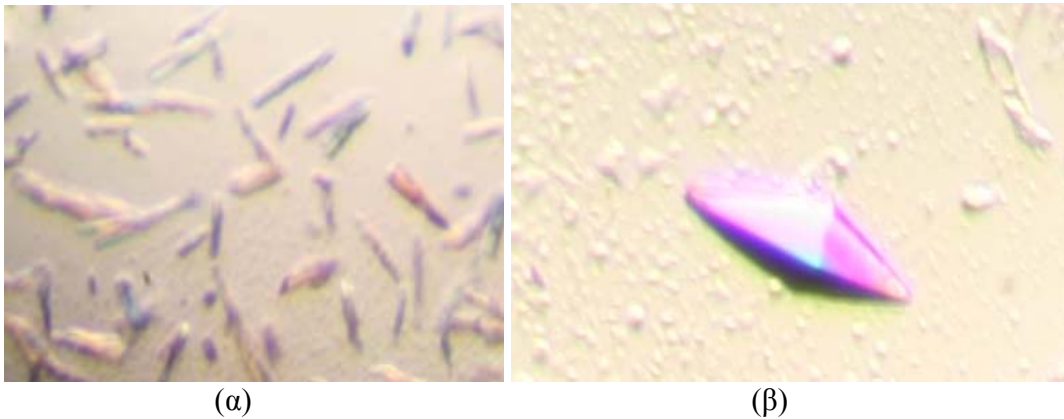
Είδος βελτιστοποίησης		R_{fact}	R_{free}
Άκαμπτου σώματος (CNS)		32.33	32.56
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot)		31.73	32.00
Θέσης (CNS) (Περιορισμοί pcs)	2κύκλοι, 200βήματα	28.82	30.86
Παράγοντα B (CNS)	30 βήματα	27.79	30.09
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (Προσθήκη μορίων νερού)		26.14	28.21
Θέσης (CNS) (Επιπρόσθετοι περιορισμοί pcs)	1κύκλος, 200βήματα	25.78	28.13
Παράγοντα B (CNS)	30 βήματα	25.49	27.97
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot)		24.86	26.59
Θέσης (CNS)	1κύκλος, 200βήματα	23.50	27.88
Παράγοντα B (CNS)	30 βήματα	23.18	27.74
Θέσης (CNS)	2κύκλοι, 100βήματα	23.02	27.24
Παράγοντα B (CNS)	5 βήματα	22.69	27.50
Θέσης (CNS)	1κύκλος, 200βήματα	22.56	27.49
Παράγοντα B (CNS)	5 βήματα	22.58	27.48
Θέσης (CNS)	1κύκλος, 100βήματα	22.56	27.37
Παράγοντα B (CNS)	5 βήματα	22.57	27.41

Επιπροσθέτα στοιχεία για την συλλογή και βελτιστοποίηση, καθώς και οι τελικοί δείκτες αξιοπιστίας δίνονται συνοπτικά στον πίνακα 3.8.

3.4. Κρυσταλλογραφική μελέτη της κυκλοφιλίνης A σε σύμπλοκο με το συνθετικό τετραπεπτιδίο suc-AFPF-pNA

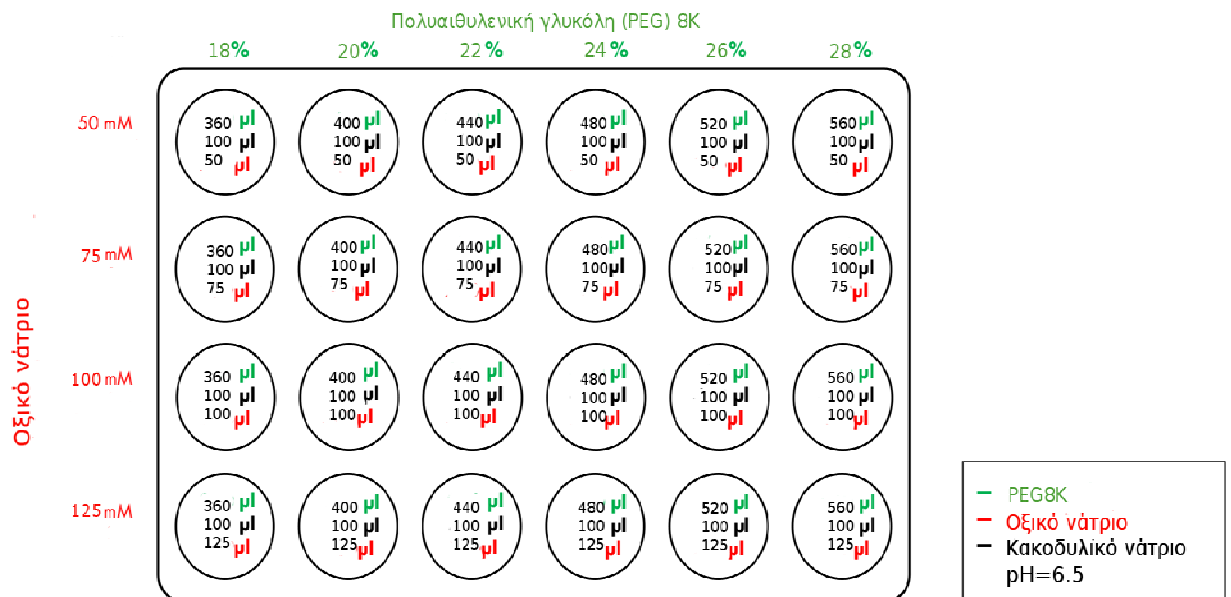
3.4.1. Κρυστάλλωση του συμπλόκου AnCyPA/suc-AFPF-pNA

Κρύσταλλοι του συμπλόκου της AnCyPA με το πεπτιδίο δημιουργήθηκαν με την μέθοδο διάχυσης ατμών της κρεμάμενης σταγόνας ως εξής: AnCyPA πρωτεΐνη (8 mg/ml) σε διάλυμα 35 mM HEPES pH 8.0, 70 mM NaCl αναμίχθηκε με 5 mM τετραπεπτιδίου suc-AFPF-pNA, 0.45 M LiCl σε τριφθοροαιθανόλη σε αναλογία 1:10 και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Η σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης με την χρήση του Crystallization Basic kit 82009 (Sigma) παρήγαγε ραβδόμορφους κρυστάλλους στις συνθήκες που δίνονται στον πίνακα 3.2.



Σχήμα 3.10.α. Βελονοειδείς (μη αξιοποιήσιμοι) κρύσταλλοι του συμπλόκου AnCyPA/AFPf, που σχηματίστηκαν με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας **β.** Κρυσταλλογραφικά αξιοποιήσιμος μονοκρύσταλλος σχήματος δι-πυραμίδας του συμπλόκου AnCyPA/AFPf, που σχηματίστηκε με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Χρήση εμπορικού kit (Sigma).

Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια βελτιστοποίησης της συνθήκης #28 (Σχήμα 3.10.α.), μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις του οξικού νατρίου και του κατακρημνιστή (PEG 8000) (σχήμα 3.11.), που τελικά έδωσε κρυστάλλους σχήματος δι-πυραμίδας και αξιοποιήσιμους κρυσταλλογραφικά (Σχήμα 3.10.β).



Σχήμα 3.11. Ανάπτυξη δισδιάστατου πειράματος εξετάζοντας την συγκέντρωση του κατακρημνιστή PEG8000 και την συγκέντρωση του άλατος του οξικού νατρίου

Σταγόνες προετοιμάστηκαν με την ανάμιξη 5μl του πρωτεϊνικού διαλύματος, 0.8 μl από 5mM πεπτίδιο/τριφθοροαιθανόλη/0.45 M LiCl και 4.2μl διάλυμα καθίζησης (19% (w/v) πολυαιθυλενογλυκόλη 8000, 0.1 M κακοδυλικό νάτριο, 0.1 M οξικό νάτριο) και ακολούθησε η έκθεσή τους πάνω από τα αντίστοιχα πηγαδάκια που περιείχαν 1 ml από το τελευταίο. Κρύσταλλοι σε σχήμα δίδυμης πυραμίδας σχηματίστηκαν στους 18°C έπειτα από δυο εβδομάδες.

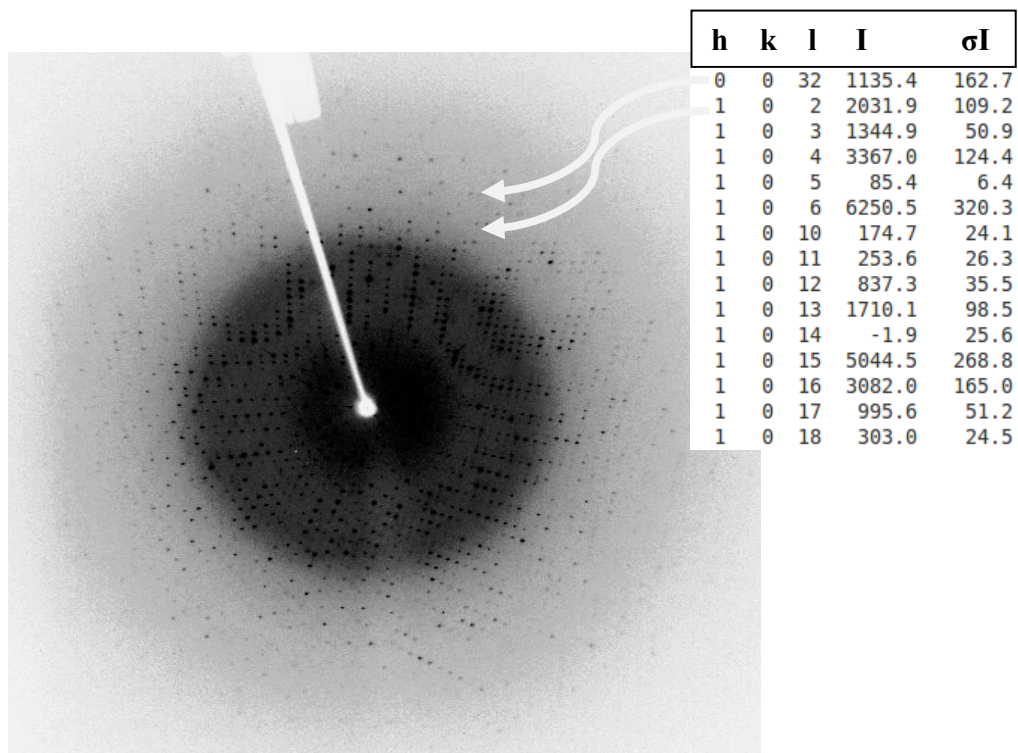
Τα παρακάτω διαλύματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύσουν τους κρυστάλλους του πρωτεϊνικού συμπλόκου (Πίνακας 3.5). Τελικά, το καλύτερο κρυοπροστατευτικό διάλυμα για τους κρυστάλλους αποδείχθηκε πως ήταν το 20% PEG 400 σε μητρικό διάλυμα.

Πίνακας 3.5. Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για κρυστάλλους AnCyPA/AFPF

20% PEG400	20% Γλυκερόλη
30% PEG400	30% Γλυκερόλη
40% PEG400	40% Γλυκερόλη

3.4.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων μονοκρυστάλλου του συμπλόκου AvCyPA/suc-AFPF-pNA

Ένας κρύσταλλος του συμπλόκου AvCyPA/suc-AFPF-pNA με διαστάσεις περίπου 0.3 x 0.3 x 0.3 mm, αφού μεταφέρθηκε σε διάλυμα κρυοπροστασίας 20% PEG 400, 19% (w/v) PEG 8000, 0.1 M κακοδυλικό νάτριο, 0.1 M οξικό νάτριο και έπειτα αστραπιαία σε ρεύμα N₂ για συλλογή δεδομένων στους 100 K, χρησιμοποιήθηκε για συλλογή δεδομένων με χρήση Rigaku CuK α ως πηγή ακτινοβολίας και έναν RAXIS-IV ως ανιχνευτή (Rigaku MSC, Inc.).



Σχήμα 3.12. Εικόνα περίθλασης από ακτινοβολία μονοκρυστάλλου του συμπλόκου AvCyPA/AFPf με ακτινοβολία Cu K α σε ανάλυση 2.2 Å

Τα δεδομένα περίθλασης για την δομή του πρωτεϊνικού συμπλόκου σε ανάλυση 2.0 Å συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με το υπολογιστικό πακέτο HKL. Τα δεδομένα αρχικά υπεδείκνυαν πως οι κρύσταλλοι ανήκαν σε τετραγωνικό σύστημα με συμμετρία Laue 422 (σχήμα 3.12.), αλλά ο καθορισμός της ομάδας χώρου δεν εντοπίστηκε σε αυτό το σημείο εξαιτίας ανεπαρκών δεδομένων για συστηματικές αποσβέσεις στους άξονες. Ωστόσο, περιορίστηκαν οι πιθανές ομάδες χώρου (Πίνακας 3.6) στις οποίες αναζητήθηκε

λύση της δομής. Ο υπολογισμός του συντελεστή Matthews (Kantardjieff & Rupp, 2003) ($1.86 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$) υπέδειξε ένα μόριο του ενζύμου στην ασύμμετρη μονάδα και 33.79% ποσοστό διαλύτη.

Πίνακας 3.6. Οι πιθανές ομάδες χώρου που αναζητήθηκε η λύση της δομής του συμπλόκου AnCyPA/AFPF

Bravais πλέγμα	Ομάδα χώρου	Συνθήκες παρατήρησης ανάκλασης κατά μήκος του άξονα ελίκωσης
Τετραγωνικό (<i>P</i>)	<i>P</i> 422	
	<i>P</i> 42 ₁ 2	(0,2n,0)
	<i>P</i> 4 ₁ 22	(0,0,4n)
	<i>P</i> 4 ₃ 22	(0,0,4n)
	<i>P</i> 4 ₂ 22	(0,0,2n)
	<i>P</i> 4 ₂ 2 ₁ 2	(0,0,2n), (0,2n,0)
	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2	(0,0,4n), (0,2n,0)
	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	(0,0,4n), (0,2n,0)

3.4.3. Καθορισμός της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου AnCyPA/AFPF

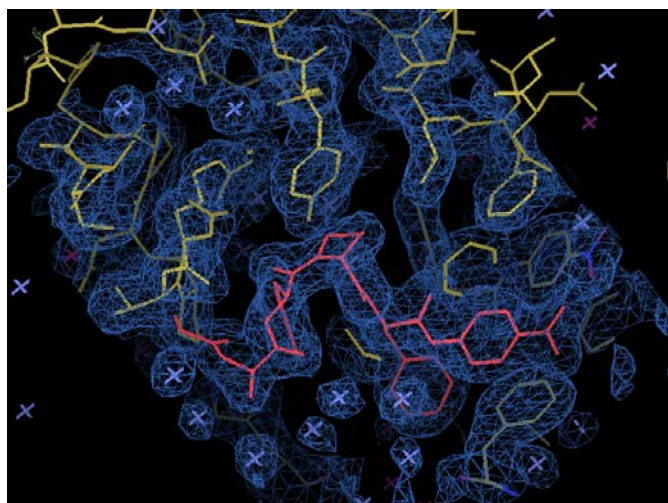
Η δομή του συμπλόκου AnCyPA-AFPF επιλύθηκε με μοριακή αντικατάσταση με την χρήση του προγράμματος AmoRe από το πακέτο CCP4 και με την κρυσταλλική δομή της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης-A από το *E. coli* (PDB: 1LOP) ως αρχικό μοντέλο. Η συστηματική διερεύνηση των συναρτήσεων περιστροφής και μετατόπισης για διάφορες πιθανές ομάδες χώρου οδήγησε σε μια λύση στην ομάδα *P*4₂2₁2, που αντιστοιχεί σε ένα πρωτεϊνικό μόριο ανά ασύμμετρη μονάδα και σε καμιά λύση για τις υπόλοιπες ομάδες. Αυτή η λύση έπειτα από βελτιστοποίηση άκαμπτου σώματος οδήγησε σε τιμές 0.659 για τον συντελεστή συσχέτισης και 39.7% για τον παράγοντα *R*. Η ανοικοδόμηση του μοριακού μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα COOT και βελτιστοποιήθηκε με το CNS. 10% των δεδομένων δεσμεύτηκαν για τον υπολογισμό του παράγοντα *R*_{free}. Τα μόρια νερού αναγνωρίστηκαν με το COOT, ενώ με την βοήθεια προγραμμάτων από την πλατφόρμα PRODRG (Schüttelkopf & Van Aalten, 2004) δημιουργήθηκαν τα βοηθητικά αρχεία, ώστε να συμπεριληφθεί και το συνθετικό τετραπεπτίδιο (sucAFPFPNA) στην βελτιστοποίηση της δομής. Συνεχείς κύκλοι

ανοικοδόμησης του μοντέλου και βελτιστοποίησης τόσο των θέσεων όσο και του παράγοντα B των ατόμων του οδήγησαν σε ένα τελικό μοντέλο με δείκτες αξιοπιστίας $R=20.13\%$ και $R_{\text{free}}=23.81\%$ (Σχήμα 3.13). Επιπρόσθετα στοιχεία για την συλλογή και βελτιστοποίηση δίνονται συνοπτικά στον πίνακα 3.8. Οι συντεταγμένες του μοντέλου έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (3T1U).

Πιο αναλυτικά, τα στάδια βελτιστοποίησης της δομής δίνονται στον πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7. Στάδια βελτιστοποίησης της δομής του συμπλόκου AnCyPA/AFP

Είδος βελτιστοποίησης		R_{fact}	R_{free}
Ακαμπτου σώματος (CNS)		39.7	32.23
Θέσης (CNS)	1 κύκλος, 200βήματα	31.67	35.23
Παράγοντα B (CNS)	30βήματα	28.92	32.24
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (Προσθήκη μορίων νερού) και βελτιστοποίηση Παράγοντα B (CNS)	30βήματα	27.11	30.31
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (προσθήκη πεπτιδίου sucAFPpNA)		26.74	28.63
Θέσης (CNS)	1 κύκλος, 200βήματα	25.78	28.49
Παράγοντα B (CNS)	30 βήματα	24.09	26.87
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (Προσθήκη μορίων νερού)		23.12	26.67
Θέσης (CNS)	1 κύκλος, 200βήματα	22.58	26.05
Θέσης (CNS)	1 κύκλος, 200βήματα	21.26	25.43
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (Προσθήκη μορίων νερού)		21.23	25.40
Θέσης (CNS)	1 κύκλος, 200βήματα	21.11	24.33
Ανοικοδόμηση μοντέλου (Coot) (Προσθήκη μορίων νερού)		20.95	24.12
Θέσης (CNS)	3 κύκλοι, 200βήματα	20.20	23.94
Παράγοντα B (CNS)	30βήματα	20.13	23.81



Σχήμα 3.13. Αντιπροσωπευτικό τμήμα του 2Fo-Fc τελικού χαρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα 1.2σ στην περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου. Το μοντέλο του πεπτιδίου απεικονίζεται με ροζ χρώμα. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Coot.

Πίνακας 3.8. Συλλογή δεδομένων και στατιστικά βελτιστοποίησης των δομών της ελεύθερης μορφής του ενζύμου της *AnCyPA* και του συμπλόκου *AnCyPA/AFPF* (Οι τιμές στις παρενθέσεις αναφέρονται στο υψηλότερης ανάλυσης κέλυφος).

<u>Δομή ενζύμου</u>	<u>Ελεύθερη μορφή</u>	<u>Σύμπλοκο με πεπτίδιο</u>
Ομάδα χώρου	$P2_1$	$P4_22_12$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας		
a (Å)	66.79	66.41
b (Å)	67.08	66.41
c (Å)	79.69	71.53
β (°)	92.73	-
Εύρος ανάλυσης (Å)	100.00 – 2.20 (2.28 -2.20)	100.00 – 2.00 (2.07-2.00)
Μοναδικές ανακλάσεις	30314 (2328)	11291 (1089)
Πληρότητα (%)	85.2 (66.9)	99.4 (98.9)
$I/\sigma(I)$	5.37 (1.75)	24.72 (4.76)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.120 (0.277)	0.054 (0.304)
R_{fact} (%)	22.57	20.13
R_{free} (%)	27.41	23.81
Άτομα πρωτεΐνης	4980	1245
Άτομα δεσμευτή	-	51
Μόρια νερού	407	118
Μέση τιμή Παράγοντα B για άτομα πρωτεΐνης (Å ²) [‡]	17.6	25.1
Μέση τιμή Παράγοντα B για άτομα δεσμευτή (Å ²) [‡]	-	22.7
RMSD (δεσμών) (Å) [§]	0.008	0.010
RMSD (γωνιών) (°) [§]	1.386	1.43

([†]) $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \bar{I}_h| / \sum_h I_{hi}$

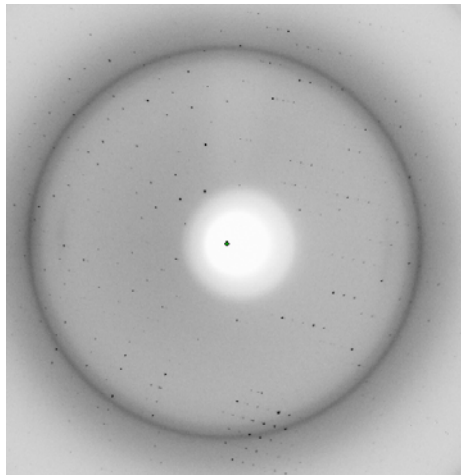
([‡]) Σύμφωνα με το πρόγραμμα BAVERAGE v6.1. (CCP4 suite)

([§]) Σύμφωνα με το πρόγραμμα Phenix (Adams et al., 2010)

3.5. Αποτελέσματα

3.5.1. Ποιότητα δεδομένων και αξιοπιστία τελικών μοντέλων

Από τον πίνακα 3.8. προκύπτει πως τα στατιστικά στοιχεία, όσον αφορά την συλλογή, επεξεργασία δεδομένων και τελικό καθορισμό της δομής για τον κρύσταλλο του συμπλόκου του ενζύμου με το τετραπεπτίδιο εμφανίζουν καλούς δείκτες. Ωστόσο, η δομή της ελεύθερης μορφής του ενζύμου παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα (π.χ. χαμηλή τιμή $I/\sigma(I)$). Αυτά τα προβλήματα πιθανόν να προέρχονται από α. το μικρό μέγεθος του κρυστάλλου, εξαιτίας του οποίου η σκεδαστική ικανότητα ήταν μικρή και β. την αδυναμία του κρυοπροστατευτικού διαλύματος να δράσει ικανοποιητικά προστατεύοντας τον κρύσταλλο. Η εμφάνιση δακτυλίων πάγου (ice rings) στην εικόνα περίθλασης του μονοκρυστάλλου της ελεύθερης μορφής του ενζύμου (Σχήμα 3.14.) είναι ενδεικτική.



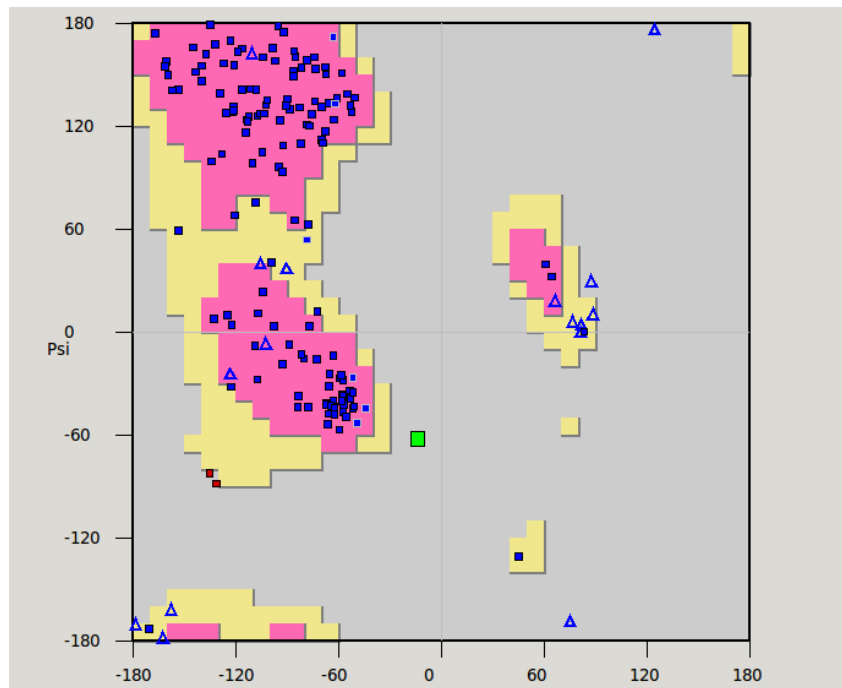
Σχήμα 3.14. Εικόνα περίθλασης μονοκρυστάλλου του ενζύμου *AzCypA*

Οι κρυσταλλικές δομές της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης-A (CyPA) από το *Azotobacter vinelandii*, τόσο στην ελεύθερη μορφή της όσο και σε σύμπλοκο με το τετραπεπτίδιο suc-AFPF-pNA επιλύθηκαν με μοριακή αντικατάσταση (Christoforides et al., 2012). Στον πίνακα 3.8, εκτός από στατιστικά στοιχεία που αφορούν στην επίλυση και βελτιστοποίηση των δομών, δίνονται και στερεοχημικές τους παραμέτροι.

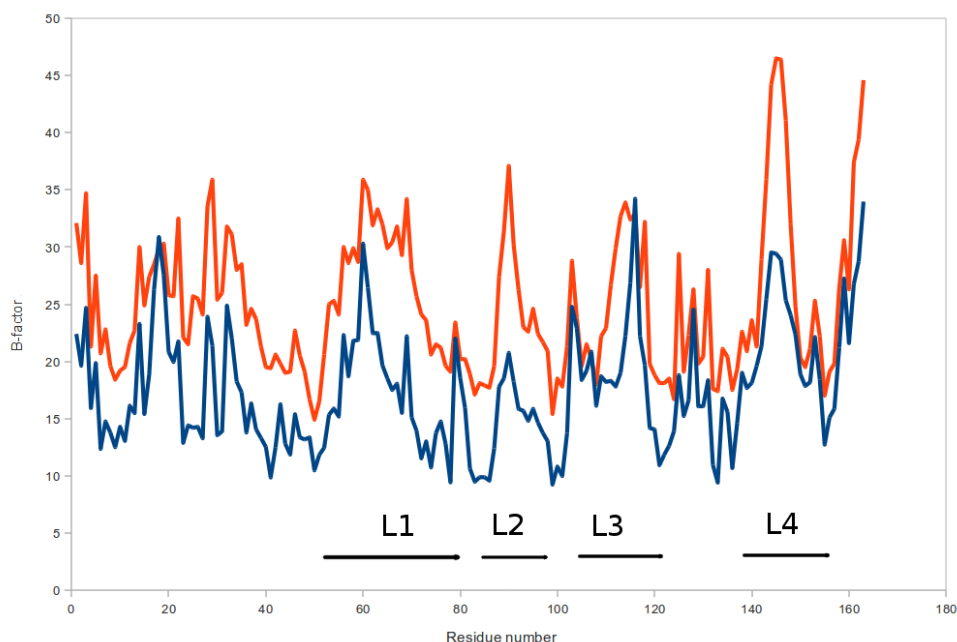
Το τελικό μοντέλο της ελεύθερης μορφής της πρωτεΐνης αποτελείται από 4 μόρια (το καθένα περιέχει 163 αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης) και 407 μόρια νερού. Επειδή η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο C-τελικό άκρο για την Glu164 ήταν πτωχή και μη ερμηνεύσιμη, το παραπάνω αμινοξικό κατάλοιπο δεν περιελήφθη στο τελικό μοντέλο. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 1, 3, 14, 18, 19, 22, 28, 29, 32, 48, 49, 54, 60, 63, 69, 88, 89, 95, 103, 116, 129, 131, 143-146, 153 και 161 έχουν πολλαπλές διαμορφώσεις η πτωχή ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Κατά τα άλλα, η πυκνότητα ήταν καλά εντοπισμένη. Η γεωμετρία της κύριας και των πλευρικών αλυσίδων αναλύθηκε με το πρόγραμμα *MolProbity* (Chen et al., 2010). Το διάγραμμα Ramachandran έδειξε πως το 81.7% του συνόλου των αμινοξέων βρίσκονται σε ευνοϊκή περιοχή, το 16.8% σε επιτρεπόμενη, το 1.4% σε γενναιόδωρα επιτρεπόμενη και το 0.0% σε απαγορευτική περιοχή. Οι παράγοντες B για την κύρια και τις πλευρικές αλυσίδες του πρωτεϊνικού μορίου A είναι 16.65 Å² και 18.25 Å², αντίστοιχα., 14.05 Å² και 15.55 Å² (για το μόριο B), 16.38 Å² και 18.13 Å² (για το μόριο C), 20.68 Å² και 21.62 Å² (για το μόριο D) όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα B-average της πλατφόρμας του CCP4 (Winn et al., 2011).

Το τελικό μοντέλο της δομής AnCyPA/AFPF αποτελείται από 163 κατάλοιπα ώριμης πρωτεΐνης, το πεπτίδιο AFPF και 118 μόρια νερού. Αφού η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο C-τελικό άκρο για την Glu164 καθώς και στο N-τελικό άκρο για τα κατάλοιπα του 6xHIS επίτοπου είναι πτωχή και μη ερμηνεύσιμη, τα τελευταία δεν περιελήφθησαν στο τελικό μοντέλο. Οι πλευρικές αλυσίδες των Lys3, Lys14, Lys32, Glu22 και Lys159 ήταν σχεδόν απύσες στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας ή είχαν πολύ πιο πτωχή πυκνότητα σε σχέση με την υπόλοιπη πρωτεΐνη. Κατά τα άλλα, η πυκνότητα ήταν καλά εντοπισμένη (Σχήμα 3.13.). Το διάγραμμα Ramachandran (Σχήμα 3.15.) έδειξε πως το 87.7% του συνόλου των καταλοίπων βρίσκονται σε ευνοϊκή περιοχή, το 10.1% σε επιτρεπόμενη, το 2.2% σε γενναιόδωρα επιτρεπόμενη και το 0.0% σε απαγορευτική περιοχή. Οι παράγοντες B για την κύρια και τις πλευρικές αλυσίδες της πρωτεΐνης είναι 24.121 Å² και 26.177 Å², αντίστοιχα, όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα B-average της πλατφόρμας του CCP4 (Σχήμα 3.16.). Οι παράγοντες B για την κύρια και τις πλευρικές αλυσίδες του πεπτιδίου είναι 21.094 Å² και 23.471 Å², αντίστοιχα. Στο σχήμα 3.21. φαίνεται η κατανομή του θερμικού παράγοντα B, όπου οι

βρόχοι L1 και L4, που δεν συμμετέχουν στην πρόσδεση εμφανίζουν υψηλή κινητικότητα.



Σχήμα 3.15. Το διάγραμμα Ramachandran για το τελικό μοντέλο της δομής του συμπλόκου Ancyra/AFPF



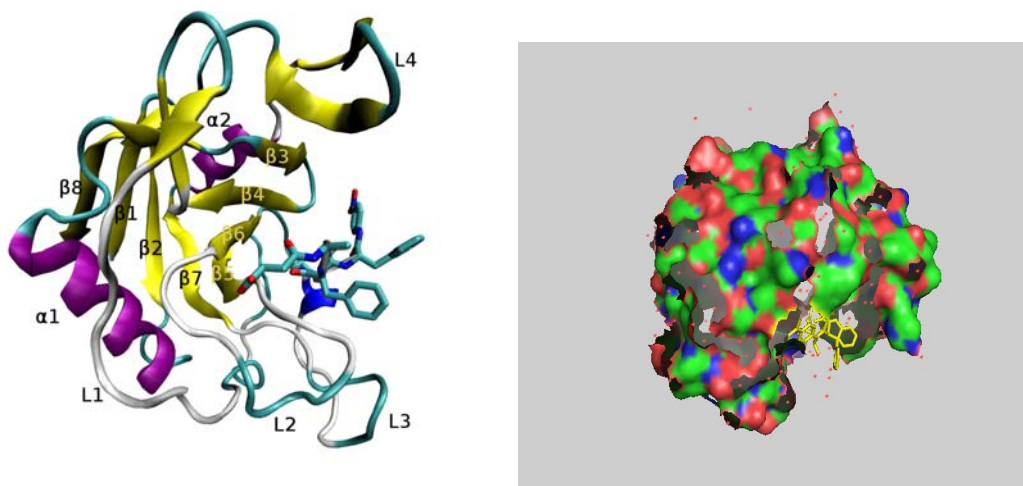
Σχήμα 3.16. Διάγραμμα του θερμικού παράγοντα B (σε \AA^2) ως προς τα αμινοξέα της δομής του ελεύθερου ενζύμου της AnCyPA (μπλε γραμμή) και της δομής του συμπλόκου AnCyPA/AFPF (πορτοκαλί γραμμή). Οι παράγοντες B για την πρώτη δομή είναι η μέση τιμή των παραγόντων B των τεσσάρων μορίων της AnCyPA στην ασύμμετρη μονάδα.

3.5.2 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης AnCyPA και του δεσμευμένου πεπτιδίου

3.5.2.α. Η συνολική δομή

Η CyPA από το *A. vinelandii* έχει μια δομή παρόμοια με αυτήν από άλλους οργανισμούς όπως του *E. coli* (Konno et al., 1996) και του ανθρώπου (Eisenmesser et al., 2005). Η δομή (σχήμα 3.17.α) αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλους β -κλώνους που σχηματίζουν δυο ορθογώνια β -ελάσματα που συγκρατούνται μεταξύ τους με H-δεσμούς, δημιουργώντας β -εξογκώματα. Υπάρχουν επίσης δυο α -έλικες $\alpha 1$ (Ala21-Asp33) και $\alpha 2$ (Thr130-Ile136), που κλείνουν το βαρέλι στα δυο άκρα του. Το πρώτο έλασμα αποτελείται από τους κλώνους $\beta 3$ (Thr39-Ile45), $\beta 4$ (Phe48-Gly53), $\beta 5$ (Tyr81-Met85) και $\beta 6$ (Glu97-Val102). Οι κλώνοι $\beta 1$ (Ser1-Thr6), $\beta 2$ (Gly9-Leu15), $\beta 7$ (Phe123-Glu128) και $\beta 8$ (Val155-Val163) σχηματίζουν το δεύτερο. Τα δυο ελάσματα ενώνονται για να

σχηματιστεί το β -βαρέλι. Ως αποτέλεσμα της ένωσης, οι κλώνοι $\beta 3$ και $\beta 7$ κυρτώνονται στα κατάλοιπα Gly38 και His42 και Phe123 και Ala127, αντίστοιχα. Τα His42 και Ala127 σχηματίζουν β -εξογκώματα για να διευκολυνθεί η κύρτωση. Επιπλέον, κύρτωση παρατηρείται στους κλώνους $\beta 5$ (Tyr81) και $\beta 8$ (Glu158). Οι β -κλώνοι και οι α -έλικες συνδέονται μέσω μεγάλων βρόχων (L1 έως L4), ένας εκ των οποίων (L3) περιέχει μια μικρή 3_{10} έλικα. Τέλος, ο βρόχος L4 περιέχει ένα μικρό β -έλασμα, το οποίο του προσδίδει ακαμψία.



Σχήμα 3.17.α. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου AnCyPA-AFPF. Τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (ribbon) και το πεπτιδίο (sticks) αναπαριστάται σχηματικά. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα VMD (Humphrey et al., 1996), **β.** Η σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου του συμπλόκου AnCyPA-AFPF (υδρόφοβες επιφάνειες, surfaces) καταδεικνύει την σφαιρικότητα της πρωτεΐνης και υποδεικνύει τη θέση πρόσδεσης του πεπτιδίου. Χρήση προγράμματος PYMOL (www.pymol.org)

3.5.2.β. Η δομή του δεσμευμένου τετραπεπτιδίου

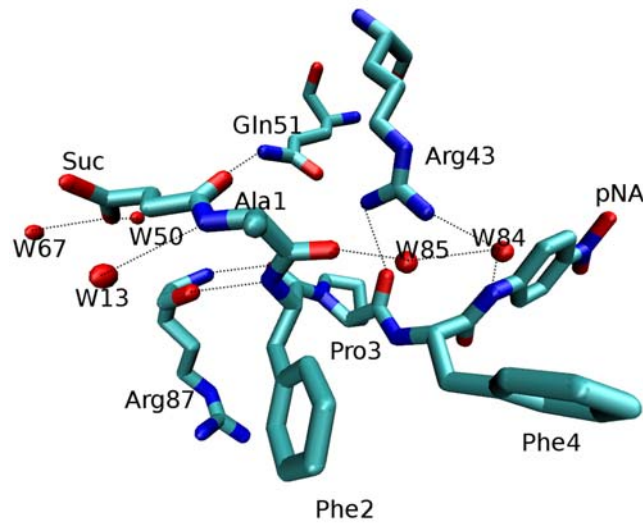
Η θέση πρόσδεσης του πεπτιδίου εντοπίζεται σε έναν υδρόφοβο θύλακα πάνω στην επιφάνεια του μορίου και σχηματίζεται κυρίως από αμινοξέα του πρώτου β -ελάσματος ($\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ και $\beta 7$) (Σχήματα 3.17.β), όπως και στις αντίστοιχες δομές συμπλόκων CyPA/πεπτιδίου που έχουν έως τώρα προσδιοριστεί. Ο υδρόφοβος θύλακας σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες έξι πολύ συντηρημένων και υδρόφοβων

αμινοξικών κατάλοιπων (Phe48, Met49, Phe107, Leu108 και Tyr120 και Phe99). Η προλίνη (Pro3) του πεπτιδίου απαντάται ως *cis* ισομερές και ο δακτύλιος εισέρχεται στον υδρόφοβο θύλακα με τέτοιο προσανατολισμό ώστε να είναι παράλληλος στον αρωματικό δακτύλιο της Tyr120. Η Pro3 έχει το σχήμα φακέλου σύμφωνα με το οποίο το C^α άτομο βρίσκεται πάνω από το επίπεδο που σχηματίζουν τα άτομα C^β-C^α-N-C^δ. Οι φ/χ γωνίες συστροφής για τα αμινοξέα Ala1, Phe2, Pro3 και Phe4 του δεσμευμένου πεπτιδίου είναι -87/-13°, -98/157°, -70/146° και -71/136°, αντίστοιχα. Ο δεσμός Phe-*cis*-Pro του τετραπεπτιδίου δημιουργεί μια δευτεροταγή δομή ανοικτής στροφής, η οποία αποτελεί την διαμόρφωση με τις ελάχιστες ενεργειακές απαιτήσεις για την *cis*-προλίνη (φ/χ = -60 ως -120°/120 ως 180°; (Ramachandran & Mitra, 1976)). Ο αρωματικός δακτύλιος του *p*-νιτροανιιδίου στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου περικλείεται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων των αμινοξέων Phe48 και Phe107 (από το συμμετρικό μόριο) και σχηματίζει *π-π* αλληλεπιδράσεις μαζί τους. Η πλευρική αλυσίδα της Phe4 είναι εκτεθειμένη προς τον διαλύτη και δεν σχηματίζει δεσμούς με γειτονικά άτομα. Ο δακτύλιος της Phe2 του πεπτιδίου είναι παράλληλος με τον δακτύλιο της Pro89 και φαίνεται να σχηματίζει δεσμό μαζί του.

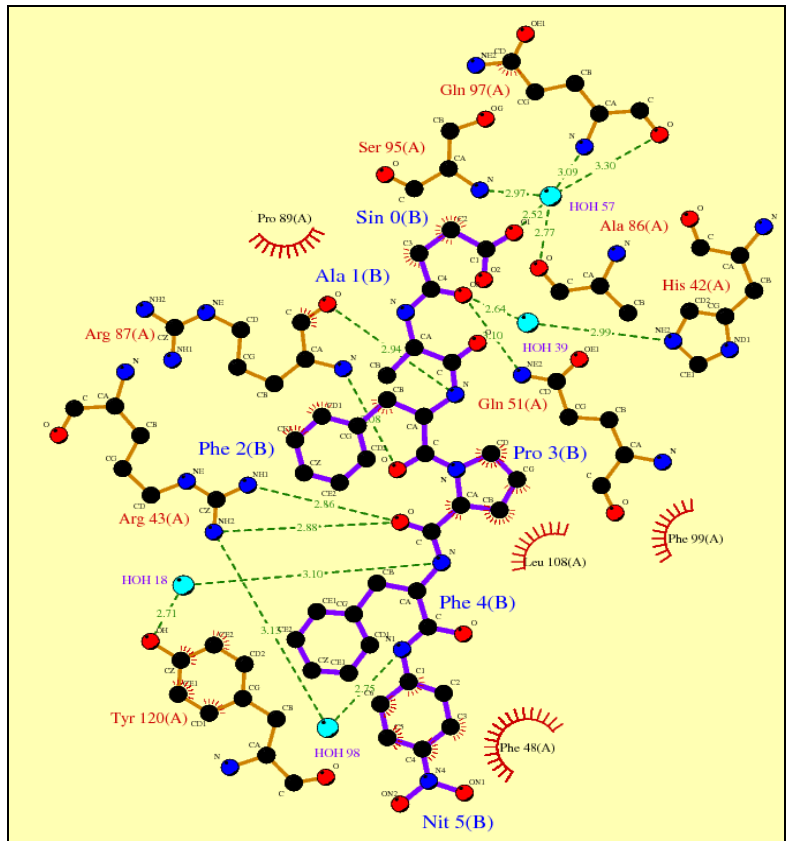
Στον πίνακα 3.9. δίνεται μια λίστα με τους H-δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ του πεπτιδίου και της πρωτεΐνης. Το καρβονυλικό οξυγόνο της προλίνης του πεπτιδίου σχηματίζει H-δεσμούς και με τις δυο αμινομάδες (N^{h1} και N^{h2}) της Arg43, που συμμετέχει στον μηχανισμό κατάλυσης (Arg55 στην ανθρώπινη CyPA). Η ομάδα N^{h1} της Arg43 σχηματίζει επίσης H-δεσμό με το O^{e1} της Gln51 (όπως συμβαίνει αντίστοιχα και με την Gln63 στην ανθρώπινη CyPA). Αξίζει να σημειωθεί εδώ η παρουσία ενός μορίου νερού που σχηματίζει H-δεσμούς με την γουανιδινική ομάδα της Arg43 και το N¹ άτομο της ομάδας της *p*-νιτροφαινόλης του πεπτιδίου (δρώντας ως γέφυρα μεταξύ πρωτεΐνης και πεπτιδίου) (Σχήμα 3.18). Ένα μόριο νερού στην ίδια θέση παρατηρείται και στην δομή της ανθρώπινης CyPA με το πεπτίδιο suc-AGPA-pNA (PDB: 1ZKF; Eisenmesser et al., αδημοσίευτο). Σε αυτήν την δομή, τόσο η Arg55 όσο και η *p*-νιτροφαινολομάδα υιοθετούν παρόμοιες διαμορφώσεις με αυτές της δομής της AvCyPA.

Η καρβονυλομάδα του αμινοξέως της Phe2 του πεπτιδίου σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με την αμινομάδα της Arg87, ενώ η αμινομάδα του ίδιου αμινοξέως με την καρβονυλομάδα της Arg87, σχηματίζοντας έτσι ένα μικρό αντιπαράλληλο β-κλώνο. Στο

άμινο τελικό άκρο του πεπτιδίου, το καρβονύλιο του ηλεκτρικού οξέως δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με το N^{e2} άτομο της Gln51. Παράλληλα, η καρβοξυλομάδα του ηλεκτρικού οξέως στο άμινο τελικό άκρο του πεπτιδίου σχηματίζει Η-δεσμούς με δυο μόρια νερού που δρουν ως γέφυρες μεταξύ πεπτιδίου και πρωτεΐνης (Σχήμα 3.19.).



Σχήμα 3.18. Λεπτομερής αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδίου. Απεικονίζονται τα αμινοξέα του ενζύμου και τα μόρια νερού που εμπλέκονται σε πολικές αλληλεπιδράσεις με το πεπτίδιο, ενώ οι Η-δεσμοί απεικονίζονται με στικτές γραμμές. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα VMD.



Σχήμα 3.19. Πολικές και υδρόφοβες και π - π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων και μορίων νερού με το τετραπεπτίδιο. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα LigPlot (Wallace et al., 1995)

Πίνακας 3.9. Δεσμοί Η και μήκη σε (Å)

Ανάμεσα στο πεπτίδιο και την ΑνCyPA/ μόρια νερού

Suc O ¹	W67	2.75
Suc O ¹	W50	2.56
Suc O ³	W34	2.56
Suc O ³	Gln51 N ^{ε2}	3.13
Ala1 N	W13	3.00
Ala1 O	W85	2.61
Phe2 N	Arg87	2.92
Phe2 O	Arg87 N	2.96
Pro3 O	Arg43 N ⁿ¹	2.83
Pro3 O	Arg43 N ⁿ²	2.86
Phe4 N	W17	3.14
pNA N ¹	W84	2.81

Στο δίκτυο των κατάλοιπων Arg43-Gln51-Gln97

Arg43 N ⁿ¹	Gln51 O ^{ε1}	2.90
Gln51 N ^{ε2}	Gln97 O ^{ε1}	2.70
Arg43 N ⁿ²	W84	3.13

3.6. Συζήτηση

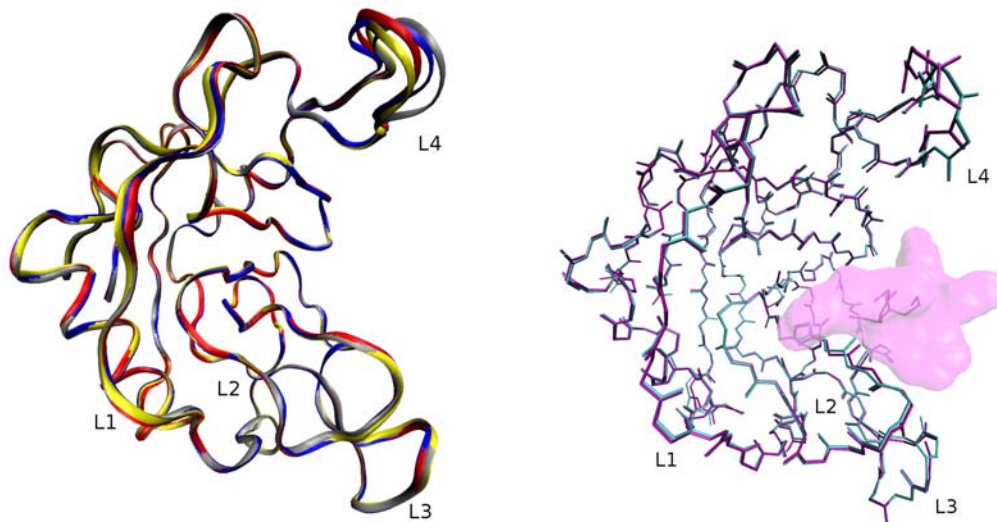
3.6.1. Σύγκριση των δομών της ελεύθερης και της δεσμευμένης στο πεπτιδίο *AnCyPA*

Η παρουσία τεσσάρων μορίων στην ασύμμετρη μονάδα της δομής της ελεύθερης μορφής της *AnCyPA* μας δίνει την δυνατότητα να εντοπίσουμε περιοχές με δομικές διαφοροποιήσεις. Η υπέρθεση των τεσσάρων μορίων της ελεύθερης μορφής της πρωτεΐνης φανερώνει πως οι μεγαλύτερες δομικές διαφοροποιήσεις συμβαίνουν στον βρόχο L4 (αμινοξέα 141-147) (Σχήμα 3.20.α). Οι αποκλίσεις από την ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής για τις θέσεις όλων των Ca ατόμων της υπέρθεσης για τα 4 μόρια της ελεύθερης μορφής της *AnCyPA* είναι 0.299 Å, ενώ μεταξύ της *AnCyPA* και του συμπλόκου *AnCyPA*-πεπτιδίο είναι 0.327 Å. Ενώ, οι πλευρικές αλυσίδες των επιφανειακών αμινοξέων υιοθετούν πολλαπλές διαμορφώσεις λόγω του διαφορετικού κρυσταλλικού περιβάλλοντος, τα αμινοξέα που βρίσκονται προς τον πυρήνα της δομής εμφανίζουν παρόμοιες διαμορφώσεις και στα 4 μόρια. Ωστόσο, το αμινοξύ της Met49 (Met61 στην ανθρώπινη CyPA), το οποίο θεωρείται τμήμα ενός δυναμικού δικτύου τεσσάρων αμινοξέων, που εμπλέκεται στην μετάβαση από μια αρχική σε μια άλλη κατάσταση του ενζύμου κατά την κατάλυση (Fraser et al., 2009), φαίνεται εδώ να παρουσιάζει μια εναλλακτική διαμόρφωση της τελικής ομάδας της πλευρικής της αλυσίδας.

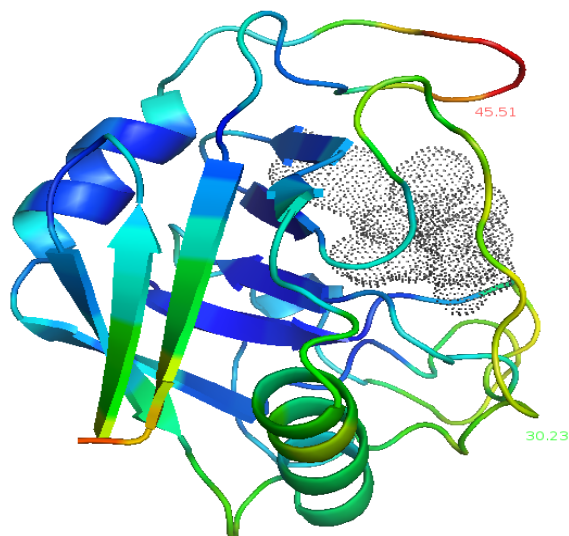
Η σύγκριση των δομών της ελεύθερης μορφής της *AnCyPA* και του συμπλόκου της με το AFPF (σχήμα 3.20.β) δείχνει πως εκτός από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στον βρόχο L4, σημαντικές δομικές μετατοπίσεις (έως 1 Å) παρατηρούνται και στην περιοχή του βρόχου L2, που αποτελείται από τα αμινοξέα 87-92. Αυτό μπορεί να είναι συνέπεια του στοιβάγματος, που περιγράφηκε νωρίτερα, μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου της Phe2 του πεπτιδίου και του δακτυλίου της Pro89 και του υδρογονικού δεσμού ανάμεσα στο πεπτιδίο και το άτομο O της καρβονυλομάδας της Arg87. Μια μετατόπιση (0.6-0.8 Å) παρατηρείται επίσης για την πλευρική αλυσίδα της Phe48 καθώς και για την σημαντική για τον καταλυτικό μηχανισμό Tyr120. Αυτά τα αμινοξέα φαίνεται να έχουν μετακινηθεί προκειμένου να δημιουργήσουν χώρο για την πρόσδεση του πεπτιδίου (σχήμα 3.19.β). Επιπροσθέτως, σημαντικές διαφορές βλέπουμε και στα αμινοξέα 114-116 του βρόχου L3, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση από το

πεπτιδίο. Το σημαντικό για την κατάλυση αμινοξυ της Arg43 καθώς και τα γειτονικά αμινοξέα της θέσης πρόσδεσης διατηρούν την ίδια διαμόρφωση και στα 4 μόρια της ελεύθερης πρωτεΐνης και στο σύμπλοκο με το πεπτιδίο.

Οι επιδράσεις από την πρόσδεση του πεπτιδίου στην δομή της πρωτεΐνης ανατακλώνται από την τιμή του θερμικού παράγοντα, ο οποίος δίνει μια ένδειξη της κινητικότητας της δομής. Έχει παρατηρηθεί ότι οι βρόχοι L1 και L4, που δεν συμμετέχουν στην πρόσδεση τριπεπτιδίου, εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές για τον παράγοντα B από ότι οι βρόχοι L2 και L3, που βρίσκονται σε επαφή με το υπόστρωμα. Ένα διάγραμμα της μέσης τιμής των παραγόντων B για όλα τα άτομα έναντι των αμινοξέων (Σχήμα 3.21.) δείχνει πως οι βρόχοι L1 και L4 χαρακτηρίζονται ως ευκίνητες. Η σύγκριση των διαγραμμάτων για την ελεύθερη πρωτεΐνη και το σύμπλοκό της με το πεπτιδίο δείχνει πως η περιοχή που αντιστοιχεί στο βρόχο L3 φαίνεται να σταθεροποιείται με την πρόσδεση του τετραπεπτιδίου όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της *EcCyPA* (Edwards et al., 1997).



Σχήμα 3.20.α. Υπέρθωση των ιχνών των ατόμων C^α της κεντρικής αλυσίδας των τεσσάρων μορίων της δομής της *AnCyPA*, **β.** Υπέρθωση των ιχνών των ατόμων C^α της κεντρικής αλυσίδας της δομής της *AnCyPA* (μόριο B, κυανό χρώμα) με εκείνη της δομής του συμπλόκου με το πεπτιδίο (μωβ χρώμα). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα VMD.



Σχήμα 3.21. Η δομή του συμπλόκου AnCyPA/AFPf χρωματισμένου σύμφωνα με την τιμή του θερμικού παράγοντα B (κατά αύξουσες τιμές του παράγοντα B: μπλε<πράσινο<κίτρινο<κόκκινο)

3.6.2. Σύγκριση με δομές της κυκλοφιλίνη-A από άλλους οργανισμούς

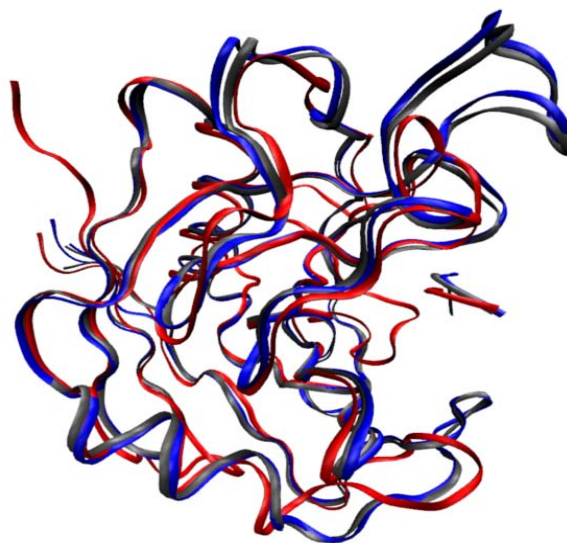
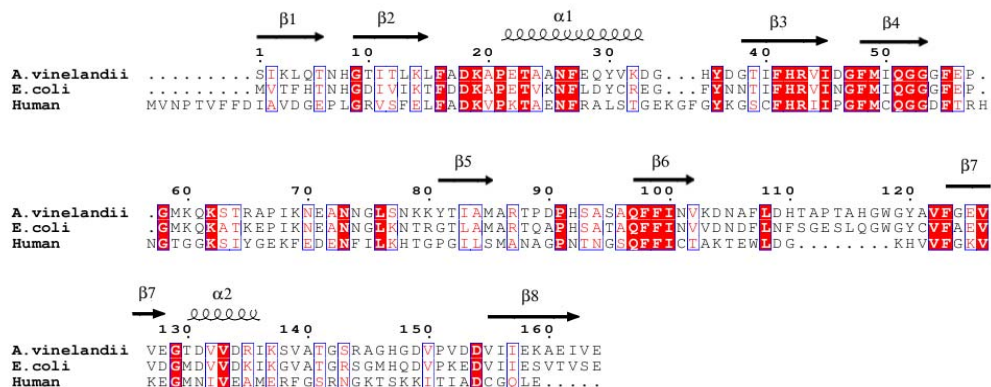
Το σχήμα 3.22.α παρουσιάζει μια ευθυγράμμιση ακολουθιών κυκλοφιλίνης από διαφορετικούς οργανισμούς με βάση τα ελάχιστα τετράγωνα δομικής υπέρθεσης. Η αμινοξική ομολογία μεταξύ AnCyPA και *E. coli* CyPA (*EcCyPA*) είναι 61.96% και μεταξύ AnCyPA και ανθρώπινης CyPA (*hCyPA*) είναι 31.11%. Αντίστοιχα, οι αποκλίσεις από την ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής για τις θέσεις των Ca ατόμων για την AnCyPA και *EcCyPA* (PDB: 1LOP, περιέχει ένα δεσμευμένο τριπεπτίδιο) είναι 0.44 Å ενώ για την AnCyPA και την *hCyPA* (PDB: 1ZKF), είναι 1.24 Å. Το σχήμα 3.21.β δείχνει την δομική υπέρθεση με βάση τα ελάχιστα τετράγωνα των δομών AnCyPA, *EcCyPA* και *hCyPA*. Η αμινοξική και δομική στοίχιση δείχνει πως ενώ ο υδρόφοβος πυρήνας της πρωτεΐνης είναι διατηρημένος σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, οι 4 βρόχοι (L1 έως L4) χαρακτηρίζονται από χαμηλή αμινοξική και δομική συντηρητικότητα καθώς και ενθέσεις και διαγραφές. Έτσι, όπως αναμενόταν, οι αμινοξικές διαφοροποιήσεις φαίνεται να συμβάλλουν σε διαφοροποιήσεις στην δομή των κυκλοφιλινών από διάφορες πηγές.

Αφού οι *AnCyPA* και *EcCyPA* βρίσκονται πιο κοντά εξελικτικά και αφού η σύγκριση *EcCyPA* και *hCyPA* έχει ήδη μελετηθεί (Konno et al., 1996), επικεντρώνουμε στην σύγκριση μεταξύ των δομών *AnCyPA* και *EcCyPA*. Η φύση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται στον υδρόφοβο πυρήνα είναι γενικά διατηρημένες. Για παράδειγμα, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ Ile2, Leu4 και Thr6 ($\beta 1$ κλώνος) με τα αμινοξέα Phe27, Phe98 και Phe41 ($\alpha 1$ έλικα, $\beta 6$ και $\beta 3$ κλώνοι) που παρατηρούνται στην *AnCyPA*, βρίσκονται επίσης στην *EcCyPA* και περιλαμβάνουν κάποιες συντηρημένες αντικαταστάσεις όπως οι αλλαγές των Ile2 \rightarrow Val2 και Leu4 \rightarrow Phe4. Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται, επίσης, μεταξύ των Ile11, Leu13 και Leu15 ($\beta 2$) με τα Ile100 ($\beta 6$), Ile83 ($\beta 5$) και Phe123 ($\beta 7$) στην *AnCyPA* (Leu13 και Leu15 αλλάζουν σε Ile13 και Thr15 στην *EcCyPA*). Στην $\alpha 1$ έλικα και T2 στροφή, οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των Phe27, Tyr30, His35 και Tyr36 κάνουν υδρόφοβες επαφές κυρίως με τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των Phe41 ($\beta 3$), Phe98 ($\beta 6$) και Phe123 ($\beta 7$) μέσα στο β -βαρέλι. Από την άλλη πλευρά, οι αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες των Thr130, Val133 και Ile136 στην $\alpha 2$ έλικα κάνουν υδρόφοβες επαφές με τις αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες των Ile11 ($\beta 2$), Val44 ($\beta 3$), Ile50 ($\beta 4$), Ile83 ($\beta 5$), Ile100 ($\beta 6$) και Val126 ($\beta 7$) μέσα στο β -βαρέλι.

Στην περιφέρεια του άνω β -ελάσματος της *AnCyPA*, οι διαμορφώσεις των βρόγχων L1, L3 και L4 και τα τμήματα που συνδέουν τις $\alpha 1$ και $\beta 3$ δομές δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνες στην *EcCyPA*. Κάποιες μικροδιαφορές στους βρόγχους L1, L3 και L4 μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην αμινοξική ακολουθία ή διαφορές στο περιβάλλον της κρυσταλλικής διεύθετησης. Στην *AnCyPA*, όπως και στην *EcCyPA*, ο σχηματισμός δυο μικρών β -κλώνων που αποτελούνται από πέντε αμινοξικά κατάλοιπα φαίνεται να σταθεροποιεί την δομή του βρόχου L4. Ομοίως, η διαμόρφωση του L1 είναι τέτοια ώστε τα κατάλοιπα Phe55, Pro57 και Met59 να κάνουν υδρόφοβες επαφές με τα κατάλοιπα His147 του βρόχου L4 και Ile40 και His42 του $\beta 3$ κλώνου, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη διεύθετηση.

Όσον αφορά την πρόσδεση του πεπτιδίου και την διαμόρφωση του υποστρώματος επιχειρούμε μια σύγκριση μεταξύ τεσσάρων αντιπροσωπευτικών δομών: *AnCyPA*, *EcCyPA* (PDB: 1LOP) και δυο ανθρώπινων CyPA: ενός συμπλόκου με το πεπτιδίο ηλεκτρίλιο-Ala-Ala-Pro-Phe-p-νιτροανιλίδιο (1RMH) (Zhao & Ke, 1996) και

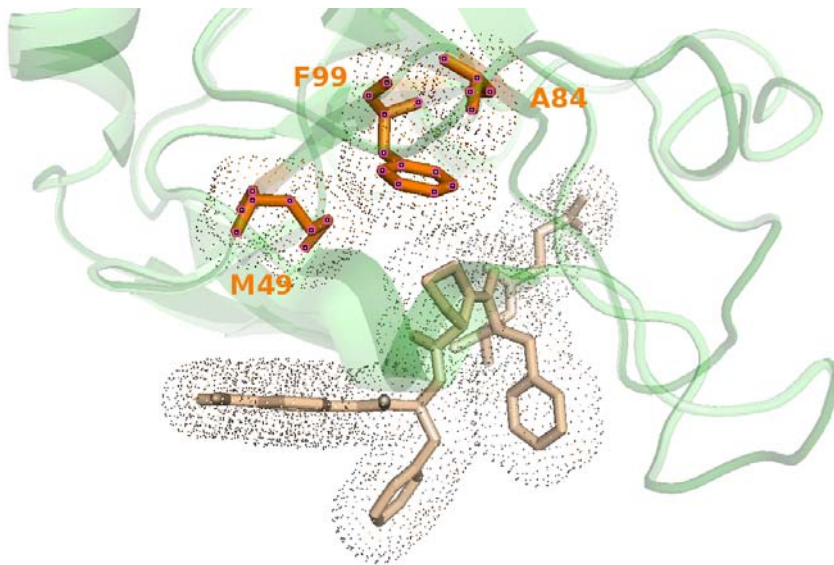
ενός άλλου με το πεπτιδίο ηλεκτρώλιο-Ala-Pro-Ala-p-νιτροανιλίδιο (1ZKF). Ο σκελετός του πεπτιδίου που δένεται στην AvCyPA παρουσιάζει παρόμοια διαμόρφωση με αυτόν στο σύμπλοκο της ανθρώπινης CyPA με το ηλεκτρώλιο-Ala-Ala-Pro-Phe-p-νιτροανιλίδιο. Οι πλευρικές αλυσίδες της Phe4 για τα διαφορετικά πεπτιδία υιοθετούν διαφορετικές ροταμερείς διαμορφώσεις, σύμφωνα με το γεγονός πως βρίσκονται εκτεθειμένη προς τον διαλύτη. Γενικά, παρατηρούμε πως το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου προσδένεται σε όλες τις δομές με πανομοιότυπο τρόπο παρά την π-π αλληλεπίδραση της ομάδας του p-νιτροανιλιδίου με συμμετρικό μόριο, όπως συμβαίνει στην AvCyPA. Ωστόσο, το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου υιοθετεί διαφορετική διαμόρφωση σε κάποιες δομές. Αυτή παρατήρηση ενισχύει την άποψη των Howard *et al.* (2003), σύμφωνα με την οποία το N-άκρο του πεπτιδίου περιστρέφεται κατά την κατάλυση ενώ το C-τελικό άκρο παραμένει σταθερό. Η πλευρική αλυσίδα της Arg43 παρουσιάζει τέτοια διαμόρφωση ροταμερούς, που δεν επιτρέπει την δημιουργία H-δεσμού του ατόμου NE της Arg43 με την Gln51, όπως συμβαίνει στην δομή της *E.coli* CyPA (1LOP). Ωστόσο, η Arg43 έχει μια παρόμοια διαμόρφωση με αυτήν που παρατηρείται στο σύμπλοκο της hCyPA με το ηλεκτρώλιο-Ala-Ala-Pro-Phe-p-νιτροανιλίδιο (1RMH).



Σχήμα A3.22.a. Ευθυγράμμιση αμινοξικών αλληλουχιών CyPA από διάφορους οργανισμούς. Τα συντηρημένα αμινοξέα είναι σημειώνονται με κόκκινο χρώμα και τα δευτεροταγή στοιχεία αναπαρίστανται επίσης. Χρήση προγράμματος EsPrirt (Gouet et al.,2003), β . Υπέρθηση των ιχνών των ατόμων C^a της κεντρικής αλυσίδας των δομών συμπλόκων της *Av*CyPA (γκρι χρώμα), *Ec*CyPA (1LOP, μπλε) και *h*CyPA (1ZKF, κόκκινο). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα VMD.

3.6.3. Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου

Προκειμένου να μελετηθεί αν το δυναμικό δίκτυο των τεσσάρων κατάλοιπων της *h*CyPA (Ser99, Phe113, Met61 και Arg55), που κατά τον Fraser εμπλέκεται στην κατάλυση (Fraser et al., 2009), παρουσιάζει παρόμοιες διαφοροποιήσεις και στην περίπτωση της *An*CyPA, σχεδιάστηκαν κατάλληλες μεταλλάξεις της *An*CyPA με σκοπό να μετρηθεί η ενεργότητα ισομεράσης στα μεταλλάγματα (σχήμα 3.23.). Πιο συγκεκριμένα, το αμινοξύ Ala84 μεταλλάχθηκε τόσο σε Ser84 όσο και σε Thr84, προκειμένου να σταθεροποιηθεί το αμινοξύ της Phe99, που συμμετέχει στον υδρόφοβο θύλακα του ενεργού κέντρου σε συγκεκριμένη διαμόρφωση. Παράλληλα, η Met49 με την ασυνήθιστη για CyPA διαμόρφωση αντικαταστάθηκε με το μικρό σε μέγεθος κατάλοιπο της αλανίνης.



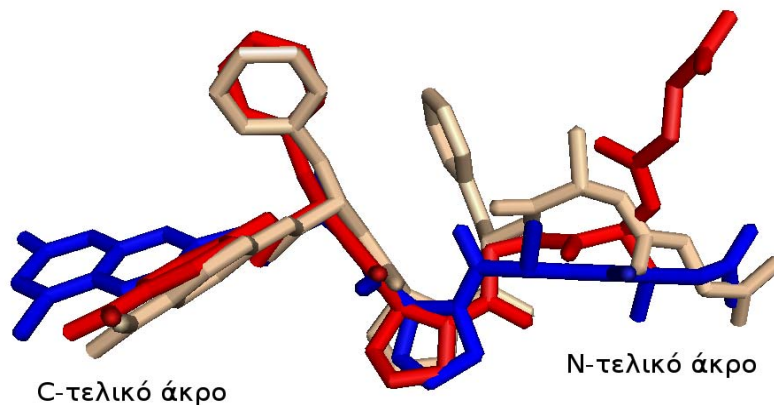
Σχήμα 3.23. Η περιοχή των 3 αμινοξικών κατάλοιπων (M49, F99 και A84) της φυσικής *An*CyPA, τα οποία μεταλλάχθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η ενεργότητα του ενζύμου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMol.

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην δράση ισομεράσης κανενός από τα μεταλλάγματα σε σχέση με το φυσικό ένζυμο. Αυτό πιθανώς να σημαίνει πως η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι ικανή να ανιχνεύσει τόσο μικρές διαφορές στην ενεργότητα και επομένως να απαιτείται μια πιο ευαίσθητη μέθοδος.

3.6.4. Συμπεράσματα – Προοπτικές

Η δομή της κυτταροπλασματικής κυκλοφιλίνης-A από το βακτήριο *Azotobacter vinelandii* είναι παρόμοια με αυτήν της αντίστοιχης από το *E. coli*. Η διαθεσιμότητα των δομικών πληροφοριών για τα 4 μόρια της ελεύθερης μορφής και το σύμπλοκο με το τετραπεπτίδιο μας επιτρέπει να διαχωρίσουμε τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν με την πρόσδεση του πεπτιδίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου από τις εκείνες που οφείλονται σε κρυσταλλικές επαφές.

Ένα τετραπεπτίδιο προσδέεται με την *cis* μορφή της προλίνης του και με το καρβόξυ άκρο να παρουσιάζει την συνήθη διαμόρφωση. Η υπέρθεση των ιχνών των ατόμων C^a της κεντρικής αλυσίδας των δομών συμπλόκων της *AvCyPA*, *EcCyPA* και *hCyPA* (σχήμα 3.24.) αποκαλύπτει πως οι δεσμευτές έχουν παρόμοια διαμόρφωση στο C-τελικό άκρο, ενώ στο N-τελικό παρατηρούνται διαφοροποιήσεις, συνηγορώντας την άποψη των Howard et al., (2003) πως το N-άκρο του πεπτιδίου περιστρέφεται κατά την κατάλυση ενώ το C-τελικό άκρο παραμένει σταθερό. Η διαθεσιμότητα της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου *AvCyPA/AFPF*, οδήγησε στην αναγνώριση καταλοίπων εκτός του ενεργού κέντρου, που μπορεί να επηρεάζουν την δράση ισομεράσης. Η μελέτη αυτή προϋποθέτει την δημιουργία μεταλλαγμάτων, την μέτρηση της ενεργότητας τους και την επίλυση της δομής τους. Εφόσον δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ενεργότητα κανενός από τα μεταλλάγματα (*AvPPIB_{A84S}*, *AvPPIB_{A84T}* και *AvPPIB_{M49A}*) σε σχέση με το φυσικό ένζυμο, ενδιαφέρουσα θα ήταν η μελέτη των δομών των μεταλλαγμάτων προκειμένου να βρεθεί ο τρόπος διευθέτησης των μεταλλαγμένων καταλοίπων που δεν επηρεάζει σημαντικά την πρόσδεση του πεπτιδίου. Ωστόσο, προκαταρκτικά πειράματα κρυστάλλωσης των τριών μεταλλαγμάτων δεν απέδωσαν. Η δομική πληροφορία για αυτά τα ένζυμα πιθανώς να εξηγήσει την συμπεριφορά τους στην αντίδραση ισομερίωσης του πεπτιδίου.



Σχήμα 3.24. Η υπέρθεση των ιχνών των ατόμων C^a της κεντρικής αλυσίδας των δομών συμπλόκων της AnCyPA (γκρι χρώμα), EcCyPA (μπλε χρώμα) και hCyPA (κόκκινο χρώμα) αποκαλύπτει πως οι δεσμευτές έχουν παρόμοια διαμόρφωση στο C-τελικό άκρο, ενώ στο N-τελικό παρατηρούνται διαφοροποιήσεις.

Τέλος, οι δομικές μελέτες που παρουσιάζονται σε αυτήν την διατριβή, εστιάζονται κυρίως σε σύμπλοκα της φυσικής και μεταλλαγμένων μορφών της AnCyPA με συνθετικά τετραπεπίδια. Ωστόσο, μελέτες του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. έδειξαν πως η δράση ισομεράσης της AnCyPA ευνοείται παρουσία του ενζύμου An dnaK, ενώ παρεμποδίζεται παρουσία της An lpxH (Dimou et al., 2011), γεγονότα που μαρτυρούν πιθανή αλληλεπίδραση της κυταροπλασματικής κυκλοφιλίνης με τα παραπάνω ένζυμα.

Οι φωσφορικές ακετυλομεταφοράσες (phosphate acetyltransferase, PTAs) είναι ένζυμα που καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά της ακετυλομάδας από ακετυλοφώσφορο στο συνέζυμοA (CoA).



Έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά δυο τέτοιες πρωτεΐνες (AnPTA-1 και AnPTA-2) από το *A. vinelandii*. Παράλληλα, ανιχνεύτηκε και εδώ πιθανή αλληλεπίδραση της AnCyPA και με τις δυο PTAs (Dimou et al., 2010). Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρουσα η δομική προσέγγιση αυτής της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δυο πρωτεϊνών, τόσο με

κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ όσο και με άλλες μεθόδους, όπως σκέδαση υπό μικρές γωνίες (Small-angle X-ray Scattering, SAXS).

Κεφάλαιο 4^ο ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

4.1. Εγκλεισμός και κρυστάλλωση με την μέθοδο αργής ψύξης

4.1.1. Τα σύμπλοκα (*d,l*)-βορνεόλης/ α -CD

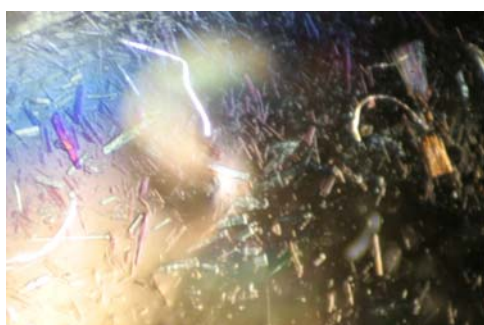
Στην παρούσα κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής α -CD (Fluka) και ως ξενιζόμενα μόρια τα εναντιομερή *d*- και *l*-βορνεόλης (Sigma-Aldrich ή Fluka). 30mg α -CD (0.03mmoles) ζυγίστηκαν και αραιώθηκαν σε τελικό όγκο dH₂O 2ml σε κωνική φιάλη. Προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα από κάθε εναντιομερές (4.756mg, 0.03mmoles) προς σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού *d*- ή *l*-βορνεόλης/ α -CD. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν μηχανικά σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 23°C) και τοποθετήθηκαν σε πυρίμαχους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τον ίδιο τρόπο, δοκιμάστηκαν και άλλες αναλογίες ξενιστή προς ξενιζόμενου μορίου προκειμένου να εντοπιστεί η βέλτιστη για το σχηματισμό μονοκρυστάλλων. Οι ακριβείς αναλογίες δίνονται στον πίνακα 4.1. Στην συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70°C και πραγματοποιήθηκε σταδιακή ψύξη μέχρι την θερμοκρασία των 23°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος) για χρονικό διάστημα οκτώ ημερών. Η ελάττωση της θερμοκρασίας πραγματοποιούνταν 2 φορές την ημέρα και ήταν της τάξης των 5°C τις πρώτες 3 ημέρες του πειράματος, ενώ τις υπόλοιπες η μείωση ήταν της τάξης των 4 έως 3°C. Μετά το πέρας του σταδίου ψύξης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για μια ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 18°C. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.

Πίνακας 4.1. Οι αναλογίες των μορίων *d*- ή *l*-βορνεόλης και α -CD, που εξετάστηκαν για την κρυστάλλωση των συμπλόκων τους

Κρυστάλλωση συμπλόκου <i>d</i> / α -CD			
Αριθμός Δείγματος	Αναλογία α -CD/ <i>d</i> -βορνεόλης	Ποσότητα dH_2O (mL)	Κρύσταλλοι
Δείγμα 1	1:1	2	Πρισματικοί κυρίως
Δείγμα 2	1:1.5	2	Βελονοειδείς
Δείγμα 3	1:2	2	Βελονοειδείς

Κρυστάλλωση συμπλόκου <i>l</i> / α -CD			
Αριθμός Δείγματος	Αναλογία α -CD/ <i>l</i> -βορνεόλης	Ποσότητα dH_2O (mL)	Κρύσταλλοι
Δείγμα 1	1:1	2	Πρισματικοί κυρίως
Δείγμα 2	1:1.5	2	Βελονοειδείς
Δείγμα 3	1:2	2	Βελονοειδείς

Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν ήταν άχροιοι και πρισματικοί, ενώ μερικοί βρέθηκαν να είναι βελονοειδείς (Σχήμα 4.1). Η καταλληλότερη αναλογία κρυστάλλωσης φάνηκε να είναι η 1:1 όπως είχε βρεθεί και σε προηγούμενες εργασίες του Εργαστηρίου Φυσικής του Γ.Π.Α. (Σαμαράς, 2008) και ήταν αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.



(α)



(β)

Σχήμα 4.1.α. Κρύσταλλοι συμπλόκων *d*-βορνεόλης/ α -CD και β . *l*-βορνεόλης/ α -CD

4.1.2. Τα σύμπλοκα (*d,l*)-βορνεόλης/ β -CD

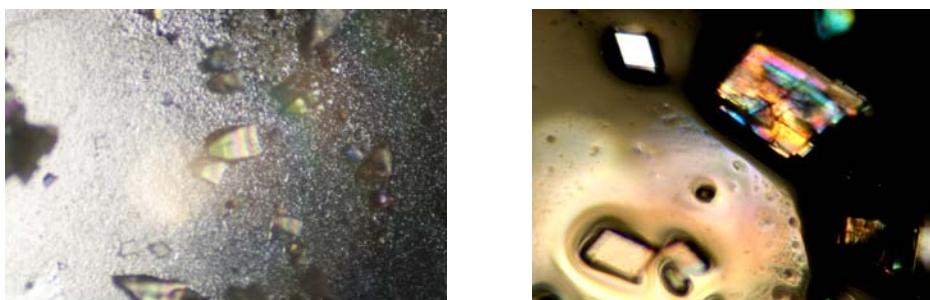
Ίδια πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την κρυστάλλωση των συμπλόκων *d*- ή *l*-βορνεόλης με ξενιστή β -CD. 30mg β -CD (0.026mmoles) ζυγίστηκαν και αραιώθηκαν σε τελικό όγκο dH₂O 2ml σε κωνική φιάλη. Ισομοριακή ποσότητα από κάθε εναντιομερές (4.055mg, 0,026mmoles) προστέθηκε προς σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού *d*- ή *l*-βορνεόλης/ β -CD.

Πίνακας 4.2. Οι αναλογίες των μορίων *d*- ή *l*-βορνεόλης και β -CD, που εξετάστηκαν για την κρυστάλλωση των συμπλόκων τους

Κρυστάλλωση συμπλόκου <i>d</i> / β -CD			
Αριθμός Δείγματος	Αναλογία β -CD/ <i>d</i> -βορνεόλης	Ποσότητα dH ₂ O(ml)	Κρύσταλλοι
Δείγμα 1	1:1	2	Πρισματικοί κυρίως
Δείγμα 2	1:1.5	2	Πρισματικοί
Δείγμα 3	1:2	2	Πρισματικοί

Κρυστάλλωση συμπλόκου <i>l</i> / β -CD			
Αριθμός Δείγματος	Αναλογία β -CD/ <i>l</i> -βορνεόλης	Ποσότητα dH ₂ O(ml)	Κρύσταλλοι
Δείγμα 1	1:1	2	Πρισματικοί κυρίως
Δείγμα 2	1:1.5	2	Πρισματικοί
Δείγμα 3	1:2	2	Πρισματικοί

Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν ήταν στο σύνολό τους πρισματικοί και άχροοι (Σχήμα 4.2.). Η καταλληλότερη αναλογία κρυστάλλωσης φάνηκε να είναι η 1:1, όπως είχε βρεθεί και σε προηγούμενες εργασίες του Εργαστηρίου Φυσικής του Γ.Π.Α. (Χατζηπέρος, 2010).



Σχήμα 4.2.α. Κρύσταλλοι συμπλόκων *d*-βορνεόλης/ β -CD και β . *l*-βορνεόλης/ β -CD

4.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων

4.2.1. Τα σύμπλοκα (*d,l*)-βορνεόλης/ α -CD

Μονοκρύσταλλοι των συμπλόκων *d*/ α -CD και *l*/ α -CD τοποθετήθηκαν στη γραμμή ακτινοβολίας X13 και X11 αντίστοιχα του DESY-Ring στο EMBL του Αμβούργου (Πίνακας 4.3.). Συλλέχθηκαν 200 και 285 εικόνες περίθλασης, αντίστοιχα με γωνία περιστροφής φ του κρυστάλλου κατά μία μοίρα. Με τον τρόπο αυτό υπερκαλύφθηκε η συνολική περιστροφή 180° που απαιτείται για τη συλλογή ανακλάσεων, που αντιστοιχούν σε όλη τη σφαίρα Ewald (ανεξάρτητα από την εμφανιζόμενη κρυσταλλογραφική συμμετρία). Ο κρύσταλλος του *d*/ α -CD συμπλόκου τοποθετήθηκε σε απόσταση 72,00 mm και του *l*/ α -CD σε απόσταση 49,12 mm από τον ανιχνευτή, αντίστοιχα. Ο χρόνος έκθεσης για καθένα από τους κρυστάλλους στην ακτινοβολία για κάθε εικόνα περίθλασης ήταν 5 και 7sec, αντίστοιχα (Πίνακας 4.3.).

Η δεικτοδότηση και τελική ολοκλήρωση των εικόνων περίθλασης έγινε με το πρόγραμμα HKL2000. Η μωσαϊκότητα των κρυστάλλων προσδιορίστηκε ίση με 0.6 και 0.5 αντίστοιχα. Από την τελική αναγωγή των δεδομένων προέκυψε ο προσδιορισμός της μοναδιαίας κυψελίδας (Πίνακας 4.4.). Η ομάδα συμμετρίας χώρου είναι $P2_12_12_1$, και στις δυο περιπτώσεις.

Με βάση αυτά τα δεδομένα και αφού ο μοριακός τύπος της α -CD είναι $C_{36}H_{60}O_{30}$ η εκτίμηση για τον αριθμό των κυκλοδεξτρινών στη μοναδιαία κυψελίδα, ακολουθώντας μια χονδρική προσέγγιση σκληρών σφαιρών Van der Waals όγκου περίπου 18 \AA^3 για

κάθε άτομο, είναι $z=8$ (Πίνακας 4.4). Από την άλλη, η ομάδα χώρου $P2_12_12_1$ ορίζει τέσσερις ασύμμετρες μονάδες και επομένως υπάρχουν 2 μόρια α -CD στην ασύμμετρη μονάδα.

Η επεξεργασία των δεδομένων για τα δυο σύμπλοκα, οδήγησε στην δημιουργία των δυο αρχείων τύπου .hkl, που περιέχουν συνολικά 5894 και 10194 ανακλάσεις αντίστοιχα. Από αυτές, οι 5729 και 10088 αντίστοιχα, είναι αρκετά αξιόπιστες ($I > 2\sigma(I)$).

Η διακριτότητα αυτών των κρυσταλλογραφικών δεδομένων φτάνει τα 1.0\AA και 0.82\AA και η πληρότητα το 98.9 και 94.2%, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.3. Χαρακτηριστικά των γραμμών ακτινοβολήσης X11 και X13 του DESY, EMBL Αμβούργου

Γραμμή Ακτινοβολήσης	X11	X13
Μονοχρωμάτορας	<i>Si(111), Οριζόντια Εστίαση</i>	<i>Si(111), Οριζόντια Εστίαση</i>
Μήκος Κύματος	<i>0.81 \AA</i>	<i>0.81 \AA</i>
Σημείο Εστίασης	<i>2mm x 0.4mm</i>	<i>2mm x 0.4mm</i>
Σχισμές	<i>0.1 x 0.1 έως 2 x 2 mm</i>	<i>0.1 x 0.1 έως 2 x 2 mm</i>
Σύστημα Ψύξης	<i>Oxford 600 series</i>	<i>Oxford Cryostream 700 series</i>
Κεντράρισμα Κρυστάλλου	<i>Χειροκίνητο</i>	<i>Χειροκίνητο</i>
Γωνιόμετρο	<i>Ενός Αξονα</i>	<i>Ενός Αξονα</i>
Ανιχνευτής	<i>MARCCD 165 mm</i>	<i>MARCCD 165 mm</i>
Ενέργεια	<i>15.3 keV</i>	<i>15.3 keV</i>

Πίνακας 4.4. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και αποτελέσματα του προσδιορισμού και της βελτιστοποίησης των κρυσταλλικών δομών των προϊόντων εγκλεισμού *d/α*-CD και *l/α*-CD

	<i>d/α</i> -CD	<i>l/α</i> -CD
Μοριακός τύπος Μοριακό βάρος Θερμοκρασία συλλογής δεδομένων Μήκος κύματος ακτινοβολίας Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου Διαστάσεις κυψελίδας Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας Z, Υπολογισθείσα πυκνότητα Συντελεστής απορρόφησης F(000) Διαστάσεις Κρυστάλλου	(C ₁₀ H ₁₈ O).(C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀) ₂ 2243.59 T = 100(2) ^o K λ = 0.8015 Å Ορθορομβικό, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ a=13.7580(1) Å α=90.00 ^o b=24.3420(2) Å β=90.00 ^o c=30.7370(4) Å γ=90.00 ^o 10293.74 (18) Å ³ 4, 1.448mg*m ⁻³ 0.132mm ⁻¹ 4626 0.30 x 0.30 x 0.30 mm ³	(C ₁₀ H ₁₈ O).(C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀) ₂ 2224.56 T = 100(2) ^o K λ =0.80510 Å Ορθορομβικό, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ a=13.889(14) Å α=90.00(0) ^o b=24.477(1) Å β=90.00(0) ^o c=30.848(1) Å γ=90.00(0) ^o 10487.1(9) Å ³ 4, 1.409 g*cm ⁻¹ 0.28mm ⁻¹ 4624 0.30 x 0.30 x 0.30 mm ³
Εύρος θ(°) για συλλογή δεδομένων Οριακοί δείκτες Συλλεγείσες ανακλάσεις/ Μοναδικές Πληρότητα ως προς θ(°)	1.20 έως 23.62 0 ≤ h ≤ 13, 0 ≤ k ≤ 24, 0 ≤ l ≤ 30 44312/5894, R(int) = 0.082 98.9%	1.77 έως 29.40 0 ≤ h ≤ 15, 0 ≤ k ≤ 29, 0 ≤ l ≤ 37 104282/10194, R(int) = 0.046 94.2%
Μέθοδος βελτιστοποίησης Δεδομένα-Περιορισμοί-Παράμετροι Δείκτης προσαρμογής επί του F ² Τελικοί δείκτες R Δείκτες αξιοπιστίας (όλα τα δεδομένα) Δρ _{max} , Δρ _{min}	Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων (LS) 5894 / 37 / 828 1.134 R ₁ =0.0954, wR ₂ =0.2915 R ₁ =0.0963, wR ₂ =0.2953 0.794 και -0.544 e*Å ⁻³	Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων (LS) 10194 / 45 / 1318 0.986 R ₁ =0.0763, wR ₂ =0.2243 R ₁ =0.0768, wR ₂ =0.2253 1.161 και -0.653 e*Å ⁻³

4.2.2. Τα σύμπλοκα (*d,l*)-βορνεόλης/ β -CD

Μονοκρύσταλλοι από κάθε σύμπλοκο τοποθετήθηκαν στις γραμμές X13 και X11 αντίστοιχα του DESY-Ring στο EMBL του Αμβούργου και συλλέχθηκαν 200 και 220 εικόνες περίθλασης, αντίστοιχα. Ο κρύσταλλος του συμπλόκου *d*/ β -CD τοποθετήθηκε σε απόσταση 72,00 mm και του *l*- β /CD σε απόσταση 45,00 mm από τον ανιχνευτή. Ο χρόνος έκθεσης του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για κάθε εικόνα περίθλασης ήταν 5 και 7 sec αντίστοιχα (Πίνακας 4.5).

Η δεικτοδότηση και τελική ολοκλήρωση των εικόνων περίθλασης έγινε με το πρόγραμμα HKL2000. Η μωσαϊκότητα των κρυστάλλων προσδιορίστηκε ίση με 0.2 και 0.5, αντίστοιχα. Από την τελική αναγωγή των δεδομένων προέκυψε ο προσδιορισμός της μοναδιαίας κυψελίδας (Πίνακας 4.5). Το κρυσταλλικό πλέγμα είναι μονοκλινές (C) και η ομάδα συμμετρίας χώρου $C222_1$.

Η ομάδα χώρου $C222_1$ ορίζει οκτώ ασύμμετρες μονάδες και επομένως υπάρχει ένα μόριο β -CD στην ασύμμετρη μονάδα.

Η επεξεργασία των δεδομένων για τα δυο σύμπλοκα, οδήγησε στην δημιουργία των δυο αρχείων τύπου .hkl, που περιέχουν συνολικά 4093 και 4337 ανακλάσεις αντίστοιχα. Από αυτές, οι 4027 και 4299 αντίστοιχα, είναι αρκετά αξιόπιστες ($I > 2\sigma(I)$)

Η διακριτότητα αυτών των κρυσταλλογραφικών δεδομένων φτάνει τα 1.0 και 1.04Å και η πληρότητα το 98.1 και 99.3%, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.5. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και αποτελέσματα του προσδιορισμού και της βελτιστοποίησης των κρυσταλλικών δομών των προϊόντων εγκλεισμού *d*/ β -CD και *l*/ β -CD

	<i>d</i> / β -CD	<i>l</i> / β -CD
Μοριακός τύπος Μοριακό βάρος Θερμοκρασία συλλογής δεδομένων Μήκος κύματος ακτινοβολίας Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου Διαστάσεις κυψελίδος Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας Z, Υπολογισθείσα πυκνότητα Συντελεστής απορρόφησης F(000) Διαστάσεις Κρυστάλλου	(C ₁₀ H ₁₈ O) _{1/2} ·(C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅) 1487.74 T = 100(2) ^o K λ = 0.8015 Å Ορθορομβικό, C222 ₁ a=19.055(1) Å α =90.00 ^o b=23.696(1) Å β =90.00 ^o c=32.357(1) Å γ =90.00 ^o 14610.1(11)Å ³ 8, 1.353mg*m ⁻³ 0.122mm ⁻¹ 6131 0.30 x 0.30 x 0.30 mm ³	(C ₁₀ H ₁₈ O) _{1/2} ·(C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅) 1449.51 T = 100(2) ^o K λ = 0.816 Å Ορθορομβικό, C222 ₁ a=19.293(5) Å α =90.00 ^o b=24.063(5) Å β =90.00 ^o c=32.873(5) Å γ =90.00 ^o 15261(6)Å ³ 8, 1.262mg*cm ⁻³ 0.113mm ⁻¹ 5966 0.30 x 0.30 x 0.30 mm ³
Εύρος θ (^o) για συλλογή δεδομένων Οριακοί δείκτες Συλλεγείσες ανακλάσεις/ Μοναδικές Πληρότητα ως προς θ (^o)	1.70 έως 23.61 0 ≤ h ≤ 19, 0 ≤ k ≤ 23, 0 ≤ l ≤ 32 31209/4093, R(int) = 0.036 98.1%	1.71 έως 24.08 0 ≤ h ≤ 19, 0 ≤ k ≤ 24, 0 ≤ l ≤ 32 47875/4337, R(int) = 0.0511 99.3%
Μέθοδος βελτιστοποίησης Δεδομένα-Περιορισμοί-Παράμετροι Δείκτης προσαρμογής επί του F ² Τελικοί δείκτες R Δείκτες αξιοπιστίας (όλα τα δεδομένα) $\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$	Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων (LS) 4093 / 44 / 558 1.179 R ₁ =0.0996, wR ₂ =0.2983 R ₁ =0.1000, wR ₂ =0.3003 1.000 και -0.487 e*Å ⁻³	Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων (LS) 4337 / 28 / 586 1.168 R ₁ =0.0964, wR ₂ =0.2957 R ₁ =0.0965, wR ₂ =0.2969 0.854 και -0.518 e*Å ⁻³

4.3. Επίλυση και βελτιστοποίηση δομών

Η διαδικασία επίλυσης και βελτιστοποίησης των δομών πραγματοποιήθηκε με χρήση των προγραμμάτων DIRDIF (P.T.Beurskens *et.al.*, 1998) και SHELXL97 (Sheldrick, 2008) αντίστοιχα, μέσα από το πακέτο WINGX (Farrugia, 1999) για την πλατφόρμα των Windows. Όπως προέκυψε από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, τα προϊόντα εγκλεισμού της βορνεόλης σε α - και β -CD κρυσταλλώνουν με μοναδιαίες κυψελίδες, που δεν έχουν αναφερθεί έως τώρα για σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών. Επομένως, δεν υπήρχε πρότυπο δομής που θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως αρχικό για να γίνει χρήση της μεθόδου ισόμορφης αντικατάστασης. Η λήψη του αρχικού προτύπου δομής έγινε τελικά με μοριακή αντικατάσταση στο χώρο Patterson με τη χρήση του προγράμματος DIRDIF.

Οι σχετικές ατομικές θέσεις για το μοριακό μοντέλο της α -κυκλοδεξτρίνης ελήφθησαν από το μόριο ξενιστή του προϊόντος εγκλεισμού isosorbide dinitrate σε διμερές α -κυκλοδεξτρίνης (Harata & Kawano, 2002) και για της β -CD από το μόριο ξενιστή του προϊόντος εγκλεισμού 4-tert-butylbenzylalcohol σε διμερές β -CD (Mentzafos et al., 1991).

Οι δομές βελτιστοποιήθηκαν με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (χρήση των F^2) με το πρόγραμμα SHELXL97 από την πλατφόρμα WINGX. Η αρχική λύση με το πρόγραμμα DIRDIF έδωσε τις συντεταγμένες των μακροκύκλων των CDs, εκτός από τα άτομα των πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων. Επίσης, των $d,l/\alpha$ -CD αποκαλύφθηκε μια από τις δυο ή τρεις θέσεις κατάληψης των ξενιζόμενων μορίων, ενώ στην περίπτωση των $d,l/\beta$ -CD φάνηκε μόνο μέρος των εξωτερικών θέσεων των εγκλεισμένων μορίων στο σχηματισθέν διμερές των β -CD. Τα υπόλοιπα άτομα των κυκλοδεξτρινών, των ξενιζόμενων μορίων και των μορίων νερού και εντοπίστηκαν με διαφορικούς χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας ($\Delta\rho$). Οι θέσεις των υδρογόνων στα πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή άτομα άνθρακα των ξενιστών τοποθετήθηκαν υπολογιστικά στις κατάλληλες θέσεις και ο συντελεστής θερμικής κίνησης ορίστηκε στην τιμή 1.2 Uiso επί των αντίστοιχων θερμικών συντελεστών των ατόμων C με τους οποίους συνδέονται.

Ο αριθμός των παρατηρούμενων ανακλάσεων δεν ήταν ικανοποιητικός για να μας επιτρέψει να θεωρήσουμε όλα τα μη υδρογονικά άτομα ως ανισοτροπικά. Έτσι, μόνο ορισμένα μη αποδιατεταγμένα άτομα των ξενιστών θεωρήθηκαν ανισοτροπικά κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Τέλος, 5 (d/α -CD), 8 (l/α -CD), 8 (d/β -CD) και 5 (l/β -CD) ανακλάσεις που παρουσιάζουν χαμηλή συμφωνία με το μοντέλο αποκλείστηκαν κατά τους τελικούς κύκλους βελτιστοποίησης.

4.4. Αποτελέσματα

4.4.1. Δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων (*d,l*)-Βορνεόλης/ *a*-CD

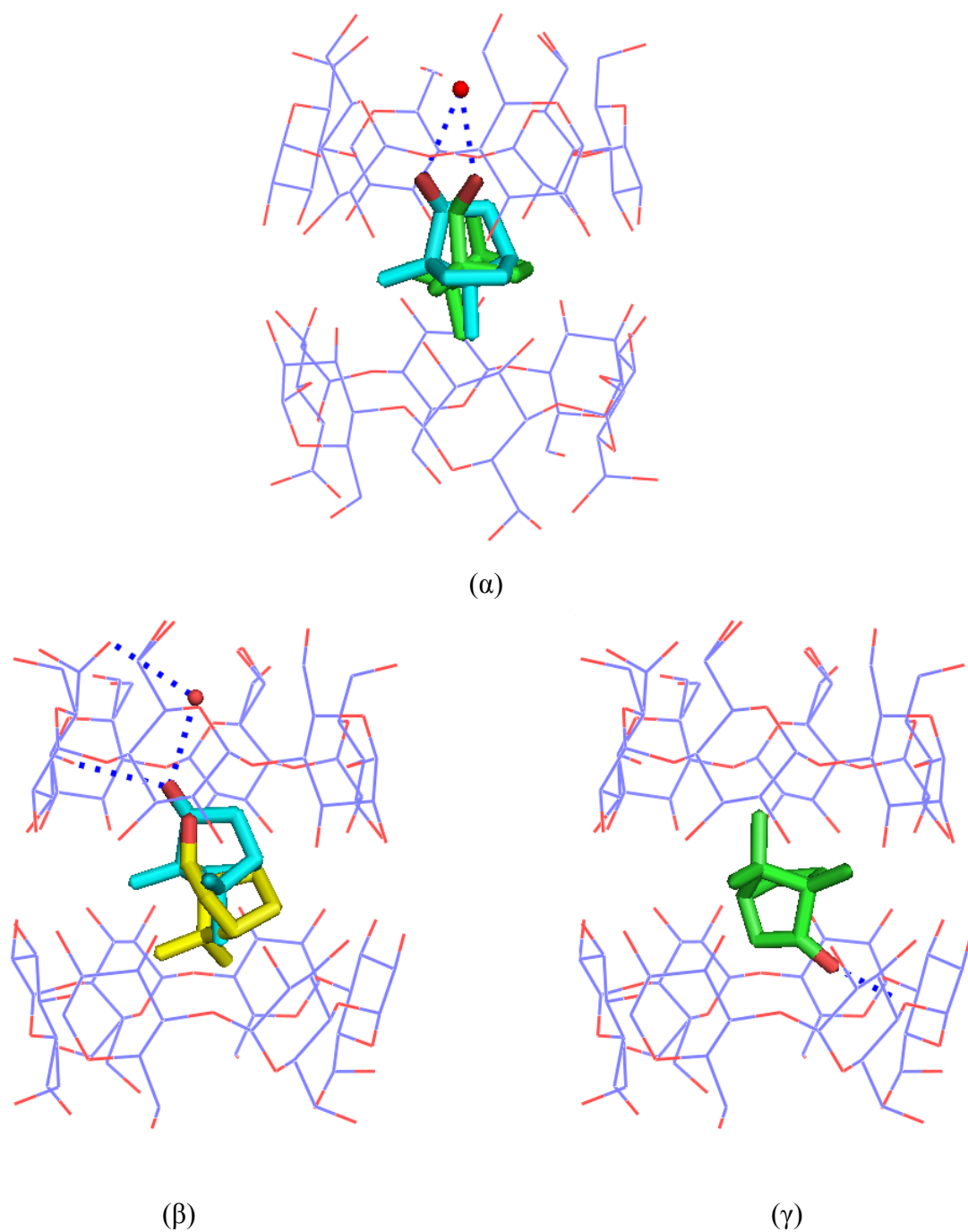
4.4.1.α. Περιγραφή των δομών

Οι δομές των συμπλόκων (*d,l*)-βορνεόλης/*a*-CD εμφανίζουν ομοιότητες με εκείνες των (*d,l*)-καμφοράς/*a*-CD (Kokkinou et al., 2010). Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει δυο *a*-CD μόρια ξενιστές (ΜόριοΑ και ΜόριοΒ) τοποθετημένα σε προσανατολισμό κεφαλής-κεφαλής και συνδεδεμένα με δεσμούς H μεταξύ των O3*n*-H υδροξυλομάδων, σχηματίζοντας διμερή. Ένα μόριο *d*-βορνεόλης, αποδιατεταγμένο σε δυο θέσεις dA και dB (με αριθμούς κατάληψης 0.80 και 0.20 αντίστοιχα) είναι τοποθετημένο μέσα στην κοιλότητα του διμερούς. Όσον αφορά το σύμπλοκο *l/a*CD, ένα μόριο *l*-βορνεόλης, αποδιατεταγμένο σε τρεις θέσεις 1A, 1B και 1C, με αριθμούς κατάληψης 0.60, 0.20 και 0.20, βρίσκεται επίσης στην κοιλότητα του διμερούς. Έτσι, η στοιχειομετρία ξενιστή προς ξενιζόμενο μόριο και στις δυο περιπτώσεις είναι 2:1. Επιπροσθέτως, στις ασύμμετρες μονάδες των συμπλόκων *d/a*CD και *l/a*CD βρέθηκαν 13.4 και 12.3 μόρια νερού αντίστοιχα, αποδιατεταγμένα σε 27 και 29 θέσεις.

Τα μόρια της βορνεόλης εντοπίζονται στο μεσοδιάστημα των διμερών μεταξύ των μέσων επιπέδων που σχηματίζουν τα O4*n*A και O4*n*B άτομα των γλυκοζιτικών μονάδων των κυκλοδεξτρινών. Τόσο η υδροξυλομάδα της βορνεόλης (σε όλες τις περιπτώσεις), όπως και το άτομο C9 της μεθυλομάδας είναι προσανατολισμένα προς τους «αντίθετους πόλους» του διμερούς, ενώ τα C8 και C10 άτομα της μεθυλομάδας προς τον «ισημερινό» του. Τα υδροξύλια των ξενιζόμενων μορίων είναι τοποθετημένα προς το μέσο επίπεδο των O4*n*A (σχήμα 4.3.α. και β.) εκτός από την περίπτωση που η ξενιζόμενη *l*-βορνεόλη καταλαμβάνει την 1B θέση και το υδροξύλιο της βρίσκεται πλησιέστερα του μέσου επιπέδου των O4*n*B (σχήμα 4.3.γ). Τα άτομα της βορνεόλης στην θέση 1B χαρακτηρίζονται από τις υψηλές τιμές θερμικών παραγόντων συγκριτικά με αυτές των αντιστοιχών ατόμων για τις θέσεις 1A και 1C. Τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλομάδων των αποδιατεταγμένων ξενιζόμενων μορίων του συμπλόκου *d/a*CD βρίσκονται σε απόσταση 0.664(3) Å (OA) ή 0.717(3) Å (OB) από το μέσο επίπεδο των O4*n*A και τα άτομα του C9 των μεθυλομάδων σε απόσταση 1.429(3) Å (C9A) και 1.374(3) Å (C9B) από το μέσο επίπεδο των ατόμων O4*n*B. Το άτομο οξυγόνου της υδροξυλομάδας της βορνεόλης στις θέσεις 1A και 1C του

συμπλόκου //aCD εντοπίζεται σε απόσταση 0.6662(17) Å (OA) και 1.6052(15) Å (OC) από το επίπεδο των O4nA και της θέσης IB σε απόσταση 0.7859(17) Å (OB) από αυτό των O4nB. Το C9 άτομο βρίσκεται σε απόσταση 1.5791(14) Å (C9A) και 0.762 Å (C9C) από το επίπεδο των O4nB ατόμων ή 1.5097(15) Å (C9B) από εκείνο των O4nA. Το άτομο C8 στην IA θέση είναι μακριά από το επίπεδο των O4nB 3.4350(17) Å, ενώ στην IC άτομο είναι σε απόσταση 1.0985(15) Å από αυτό. Έτσι, ο προσανατολισμός των θέσεων IA και IC μέσα στην κοιλότητα είναι τελείως διαφορετικός.

Ένα μόριο νερού βρίσκεται στην πρωτοταγή πλευρά του μορίου ξενιστή A και στα δυο σύμπλοκα. Εντοπίζεται μεταξύ των επιπέδων που σχηματίζουν τα άτομα C6nA και O4nA σε απόσταση 0.80(2) Å και 1.92(2) Å αντίστοιχα στο σύμπλοκο d/aCD και 0.69(2) Å και 2.04(2) Å αντίστοιχα στο σύμπλοκο //aCD. Αυτό το μόριο νερού (που το ονομάζουμε OW10) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υδροξύλιο OA και OB των θέσεων dA και dB του συμπλόκου d/a-CD [αποστάσεις OA...OW10 = 2.86(2) Å, OB... OW10 = 2.75(2) Å; γωνίες C2A-OA... OW10 = 106.9(4)°, C2B-OB... OW10 = 112.7(5)°] (Σχήμα 4.3.α.). Στην περίπτωση του //a-CD συμπλόκου, μόνο το υδροξύλιο της θέσης IA της βορνεόλης σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το μόριο νερού (που το ονομάζουμε OW17) [απόσταση OA...OW17 = 2.83(2) Å; γωνία C2A-OA...OW17 = 114.9(4)°]. Επιπλέον, στο συμπλόκου //a-CD, αυτό το μόριο νερού σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με ένα πρωτοταγές υδροξύλιο ξενιστή A [απόσταση O64C...OW17 = 3.05(3) Å; γωνία C64C-O64C...OW17 = 103.1(10)°] (Σχήμα 4.3.β.). Η υδροξυλομάδα της IA θέσης σχηματίζει επίσης υδρογονικό δεσμό με το άτομο O44A της γλυκοζιτικής μονάδας [απόσταση OA...O44A = 3.016(4) Å; γωνίες C2A-OA...O44A = 129.70(7)°, C44A-O44A...OA = 111.5(3)°] (Σχήμα 4.3.γ.).



Σχήμα 4.3. Σχηματική απεικόνιση των διμερών *d*- και *l*-βορνεόλης σε α -CD **α.** Οι υδροξυλομάδες της *dA* (κυανό χρώμα) και *dB* (πράσινο χρώμα) θέσης της *d*-βορνεόλης είναι τοποθετημένες προς το μέσο επίπεδο των $O4nA$ και σχηματίζουν Η-δεσμό με ένα μόριο νερού **β.** οι υδροξυλομάδες της *IA* (κυανό χρώμα) και *IC* (κίτρινο χρώμα) θέσης της *l*-βορνεόλης είναι τοποθετημένες προς το μέσο επίπεδο των $O4nA$ και **γ.** η υδροξυλομάδα της *IB* (πράσινο χρώμα) θέσης της *S*-βορνεόλης βορνεόλης είναι τοποθετημένη προς το μέσο επίπεδο των $O4nB$

4.4.1.β. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών

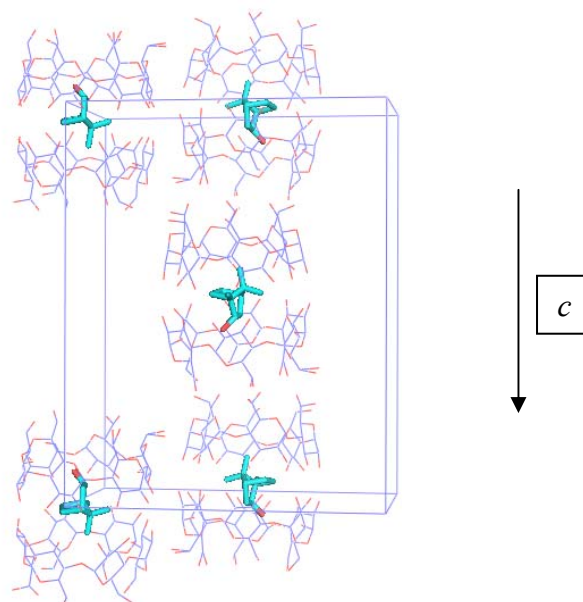
Στον πίνακα 4.6. δίνονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, που καθορίζουν την διαμόρφωση των μορίων της κυκλοδεξτρίνης. Από τον πίνακα προκύπτει πως η διαμόρφωση των μορίων της και στα δυο σύμπλοκα των α -CD είναι παρόμοια. Τα άτομα $O4n$ των γλυκοζιτικών μονάδων είναι περίπου συνεπίεδα με διακύμανση 0.129 \AA , και σχηματίζουν προσεγγιστικά ένα κανονικό εξάγωνο. Επομένως, ο μακρόκυκλος της α -CD δεν παρουσιάζει σημαντική παραμόρφωση, πράγμα που ήταν αναμενόμενο δεδομένου του μεγέθους και του σχήματος του ξενιζόμενου μορίου της βορνεόλης.

Στην περίπτωση του συμπλόκου d/α -CD, τρεις πρωτοταγείς υδροξυλομάδες των δυο μορίων ξενιστών είναι αποδιατεταγμένες σε δυο θέσεις. Στο σύμπλοκο l/α -CD δυο πρωτοταγείς υδροξυλομάδες στον ξενιστή A και τρεις στον ξενιστή B είναι αποδιατεταγμένες σε δυο θέσεις. Επίσης, ακόμη δυο πρωτοταγείς υδροξυλομάδες στον ξενιστή A είναι αποδιατεταγμένες σε τρεις θέσεις. Περισσότερες από τις μισές υδροξυλομάδες έχουν την *gauche-trans* διαμόρφωση με κατεύθυνση προς το εσωτερικό της κοιλότητας, ενώ οι υπόλοιπες έχοντας την *gauche-gauche* διαμόρφωση είναι τοποθετημένες προς το εξωτερικό τμήμα αυτής (Πίνακας 4.6.). Παρόμοια διαμόρφωση παρατηρήθηκε και στο σύμπλοκο καμφορά/ α -CD (Kokkinou et al., 2010). Αποδιατεταγμένα επίσης είναι τα άτομα C64 και C65 των δυο υδροξυλομάδων και στα δυο μόρια ξενιστές.

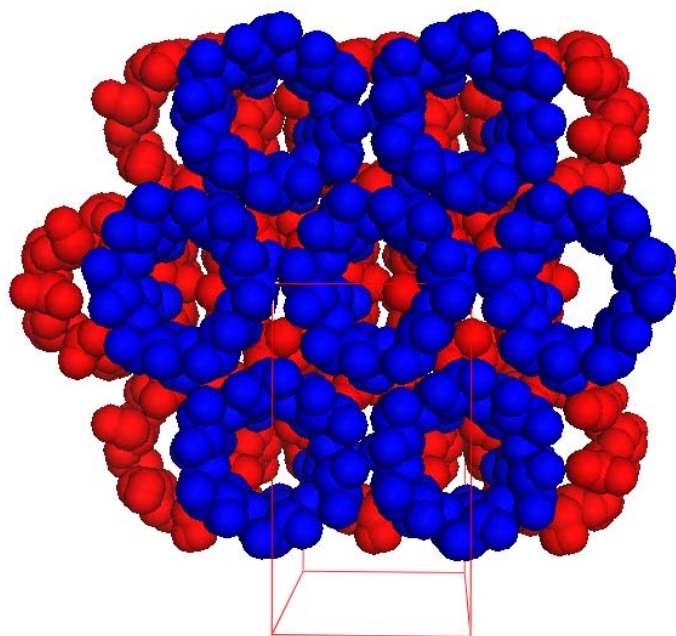
4.4.1.γ. Η κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση

Το σύμπλοκο κρυσταλλώνει σε ομάδα χώρου $P2_12_12_1$. Τα διμερή σχηματίζουν στρώσεις παράλληλες στο ab επίπεδο. Οι στρώσεις συνδέονται με άξονα περιστροφής δευτέρας τάξης, τον a -άξονα (Σχήμα 4.4.α.). Ο μοριακός άξονας των διμερών σχηματίζει γωνία 9.09° (d/α CD) ή 9.04° (l/α CD) με τον c -άξονα. Η απόσταση των προβολών των κέντρων των διμερών μιας στρώσης από το ab επίπεδο είναι 5.85 \AA (d/α CD) ή 5.98 \AA (l/α CD). Επομένως, η διάταξη των διμερών χαρακτηρίζεται ως τύπου σκακιέρας, όπως δηλαδή και εκείνο των διμερών της β -CD σε σύμπλοκο με 4-tert-butylbenzylalcohol (Mentzafos et al., 1991), που κρυσταλλώνει σε ομάδα χώρου $C222_1$, αν και η μετατόπιση των διμερών σε δυο

διαδοχικές στρώσεις είναι σημαντικά μικρότερη από την μέση τιμή που παρατηρείται στην συγκεκριμένη δομή (8.7 Å). (Σχήμα 4.4.β.). Η μικρότερη μετατόπιση μπορεί να αποδοθεί στις μικρότερες διαστάσεις της α -CD σε σχέση με την β -CD. Παρόμοια μοριακή διεύθετηση παρατηρείται στο σύμπλοκο καμφορά/ α -CD.



(α)



(β)

Σχήμα 4.4.α. Η κρυσταλλική διεύθετηση των συμπλόκων d/α -CD κατά μήκος του άξονα c . **β.** Η κρυσταλλική διεύθετηση των διμερών των συμπλόκων d/α -CD χαρακτηρίζεται ως τύπου σκακιέρας

4.4.2. Δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων (*d,l*)-Βορνεόλης/ β -CD

4.4.2.α. Περιγραφή των δομών

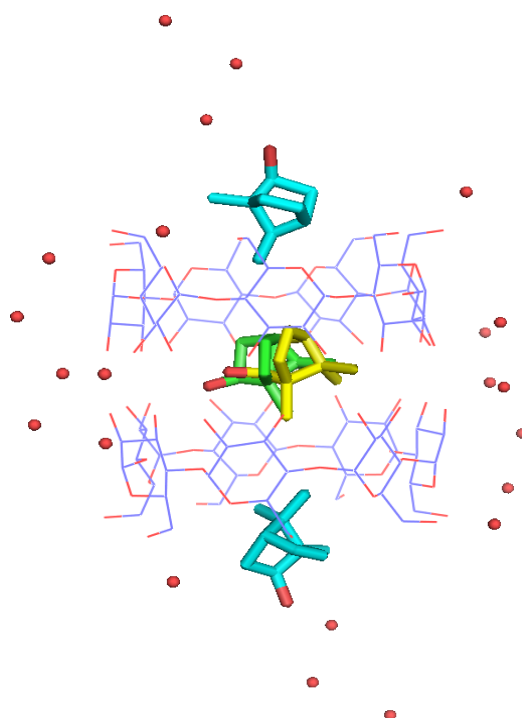
Τα σύμπλοκα d/β -CD και l/β -CD κρυσταλλώνουν σε ομάδα χώρου $C222_1$. Και στις δύο περιπτώσεις η ασύμμετρη μονάδα περιέχει ένα μόριο ξενιστή, ενώ μόρια *d*- ή *l*-βορνεόλης βρίσκονται στην περιοχή των πρωτοταγών υδροξυλίων της β -CD με αριθμό κατάληψης 1.0 (τα ονομάζουμε *dA* για το d/β -CD και *lA* για το l/β -CD) και στην περιοχή των δευτεροταγών υδροξυλίων με αριθμό κατάληψης 0.5. Στο σύμπλοκο d/β -CD το ξενιζόμενο μόριο στην περιοχή των δευτεροταγών υδροξυλομάδων βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε δυο θέσεις, *dB* και *dC*, με αριθμό κατάληψης 0.20 και 0.30, αντίστοιχα ενώ στο σύμπλοκο l/β -CD, το αντίστοιχο μόριο *lB*, δεν είναι αποδιατεταγμένο. Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει επίσης, 10.8 (d/β -CD) ή 8.6 (l/β -CD) μόρια νερού διασκορπισμένα σε 13 ή 12 θέσεις, αντίστοιχα, στον ελεύθερο χώρο γύρω από τους ξενιστές.

Δυο μόρια ξενιστές, που σχετίζονται μέσω κρυσταλλογραφικής συμμετρίας, σχηματίζουν διμερές τύπου κεφαλής-κεφαλής μέσω H-δεσμών μεταξύ των $O3n...O'3(8-n)$. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζομένου στο διμερές είναι 2:3 και στις δυο περιπτώσεις (Σχήμα 4.5.α και β.).

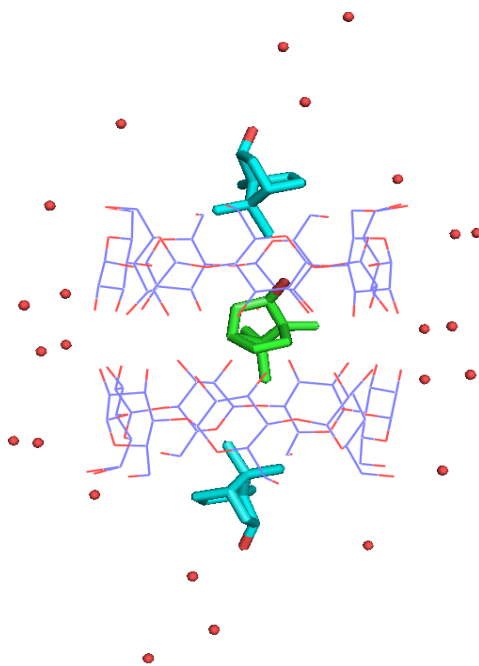
Τα ξενιζόμενα μόρια της *d*- ή της *l*-βορνεόλης που καταλαμβάνουν τις θέσεις *dA* ή *lA* αντίστοιχα, προς την πλευρά των πρωτοταγών υδροξυλίων των β -CD, βρίσκονται έξω από την κοιλότητα του διμερούς (Σχήμα 4.5.α. και β.) και διευθετούνται ως ακολούθως: Η υδροξυλομάδα της *d*-βορνεόλης που βρίσκεται στην *dA* θέση, σχηματίζει H-δεσμούς: (i) με μόριο νερού (που το ονομάζουμε OW4) στο χώρο μεταξύ των β -CD διμερών [απόσταση $OA...OW4 = 2.716(10)$ Å και γωνία $C2A-OA...OW4 = 118.4(6)^\circ$] και (ii) με μια υδροξυλομάδα της πρωτοταγούς πλευράς ενός γειτονικού διμερούς [απόσταση $OA...O66 = 2.727(10)$ Å; γωνίες $C2A-OA...O66 = 118.7(6)^\circ$, $OA...O66-C66 = 126.9(6)^\circ$]. Το OW4 επίσης συνδέεται με υδρογονικό δεσμό με πρωτοταγή υδροξυλομάδα που ανήκει σε β -CD γειτονικού μορίου [απόσταση $O64...OW4 = 2.734(10)$ Å; γωνία $C64-O64...OW4 = 122.2(5)^\circ$] (Σχήμα 4.6.α.). Ομοίως, η υδροξυλομάδα της *lA* σχηματίζει τους ακόλουθους δεσμούς υδρογόνου: (i) με μόριο νερού (που το ονομάζουμε OW2) στο χώρο μεταξύ των β -CD διμερών [απόσταση $OA...OW2 = 2.769(14)$ Å; γωνία $C2A-OA...OW2 =$

125.5(9)°], το οποίο με τη σειρά του συνδέεται με H-δεσμό με πρωτοταγή υδροξυλομάδα ξενιστή γειτονικού διμερούς [απόσταση O65...OW2 = 2.758(13) Å; γωνία C65-O65...OW2 = 119.7(6)°], και (ii) με πρωτοταγή υδροξυλομάδα ξενιστή γειτονικού διμερούς [απόσταση OA...O67 = 2.723(12) Å; γωνία C2A-OA...O67 = 109.1(9)°, C67-O67...OA = 125.2(7)°] (Σχήμα 4.6.β.). Με αυτόν τον τρόπο τα ξενιζόμενα μόρια *d*- ή *l*-βορνεόλης που βρίσκονται έξω από την κοιλότητα του διμερούς (θέσεις dA ή IA), συμμετέχουν άμεσα (μέσω των υδρογονικών δεσμών που σχηματίζουν με τα γειτονικά διμερή) ή έμμεσα (μέσω του δικτύου των H-δεσμών των μορίων νερού στο χώρο μεταξύ των διμερών) στη μοριακή διεύθυνση των υπό εξέταση συμπλόκων στον κρύσταλλο.

Τα ξενιζόμενα μόρια της *d*- ή της *l*-βορνεόλης που καταλαμβάνουν τις θέσεις dB, dC ή IB αντίστοιχα, βρίσκονται εγκλεισμένα στο μεσοδιάστημα της σχηματιζόμενης κοιλότητας των διμερών (Σχήμα 4.5.α. και β.). Η απόσταση του κεντρομερούς του εγκλεισμένου μορίου από το μέσο επίπεδο O4n της β-CD υπολογίζεται (4.286 Å) και (4.559 Å) για τις θέσεις dB και dC αντίστοιχα του συμπλόκου *d*/β-CD και (4.167 Å) για τη θέση IB του συμπλόκου *l*/β-CD. Στην περίπτωση του *d*/β-CD συμπλόκου, το εγκλεισμένο μόριο της *d*-βορνεόλης που καταλαμβάνει τη θέση dB ή τη θέση dC, προσανατολίζεται έτσι ώστε η υδροξυλομάδα του και αντιδιαμετρικά τα άτομα C8 και C9 των αντίστοιχων μεθυλομάδων του να διευθετούνται προς τον “ισημερινό” του διμερούς ενώ το άτομο C10 της αντίστοιχης μεθυλομάδας προς τον “πόλο” (Σχήμα 4.5.α..). Στην περίπτωση του *l*/β-CD συμπλόκου, αν και το μόριο της *l*-βορνεόλης βρίσκεται εγκλεισμένο στο ίδιο περίπου “βάθος” της υδρόφοβης κοιλότητας της β-CD (θέση IB) διαφοροποιείται σε σχέση με τις θέσεις IB και IC, ως προς τον προσανατολισμό του μέσα στην κοιλότητα του σχηματισμένου διμερούς των β-CDs. Συγκεκριμένα, η *l*-βορνεόλη στη θέση IB φαίνεται να έχει στραφεί σημαντικά σε σχέση με την *d*-βορνεόλη στις θέσεις dB και dC, και να προσανατολίζεται έτσι ώστε η υδροξυλομάδα του να διευθετείται προς τον “πόλο” του διμερούς σχηματίζοντας γωνία περίπου 51° με το μοριακό άξονα της β-CD ενώ το άτομο C10 της αντίστοιχης μεθυλομάδας διευθετείται προς τον “ισημερινό” (σχήμα 4.5.α. και β.).

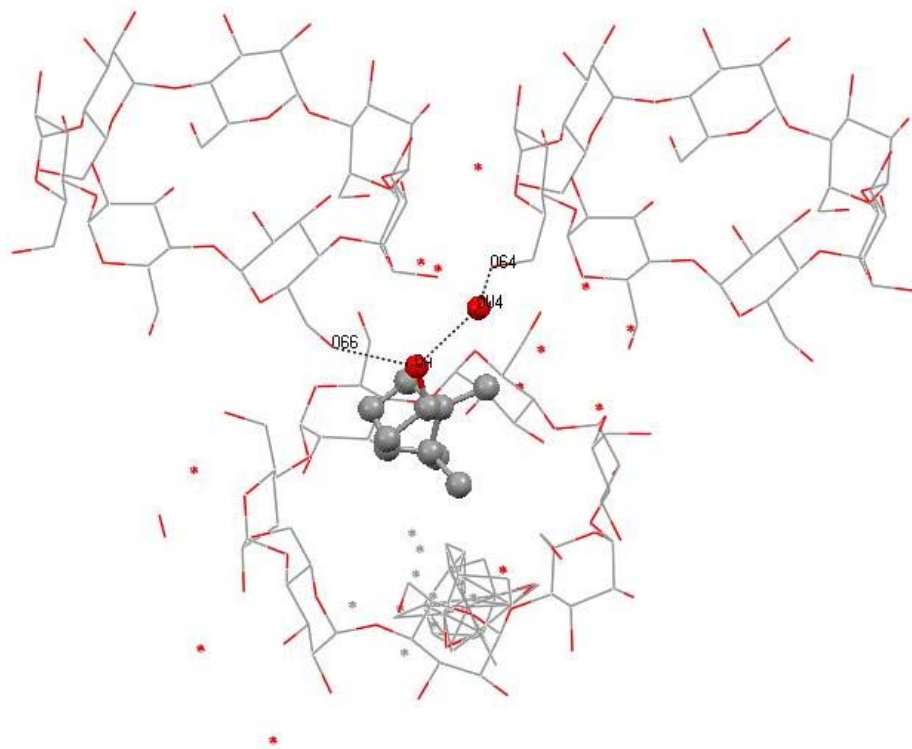


(α)

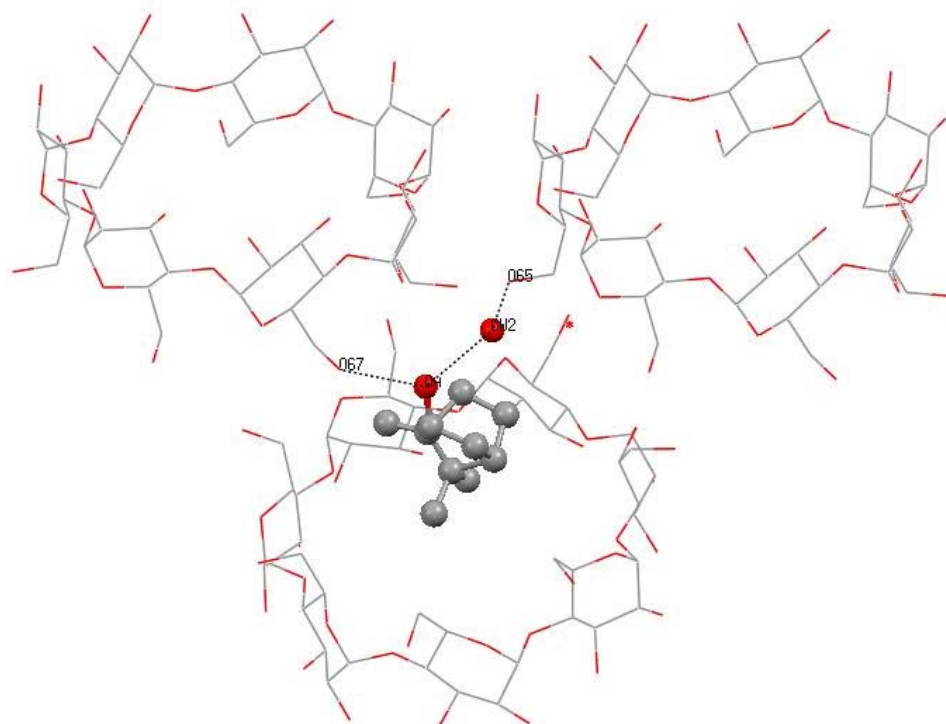


(β)

Σχήμα 4.5. Σχηματική απεικόνιση των διμερών *d*- και *l*-βορνεόλης σε β -CD **α**. Η θέση dA (κυανό χρώμα) εντοπίζεται εκτός της κοιλότητας του διμερούς, ενώ οι θέσεις dB (πράσινο χρώμα) και dC (κίτρινο χρώμα) της *d*-βορνεόλης εντός **β**. Η θέση lA (κυανό χρώμα) εντοπίζεται εκτός της κοιλότητας του διμερούς, ενώ η lB (πράσινο χρώμα) της *l*-βορνεόλης εντός



(α)



(β)

Σχήμα 4.6.α. Η υδροξυλομάδα της dA θέσης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το μόριο νερού OW4 και το O66 με γειτονικής β-CD β. Η υδροξυλομάδα της IA σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το μόριο νερού OW2 και το O67 με γειτονικής β-CD. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Mercury (Macrae et al., 2008).

4.4.2.β. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών

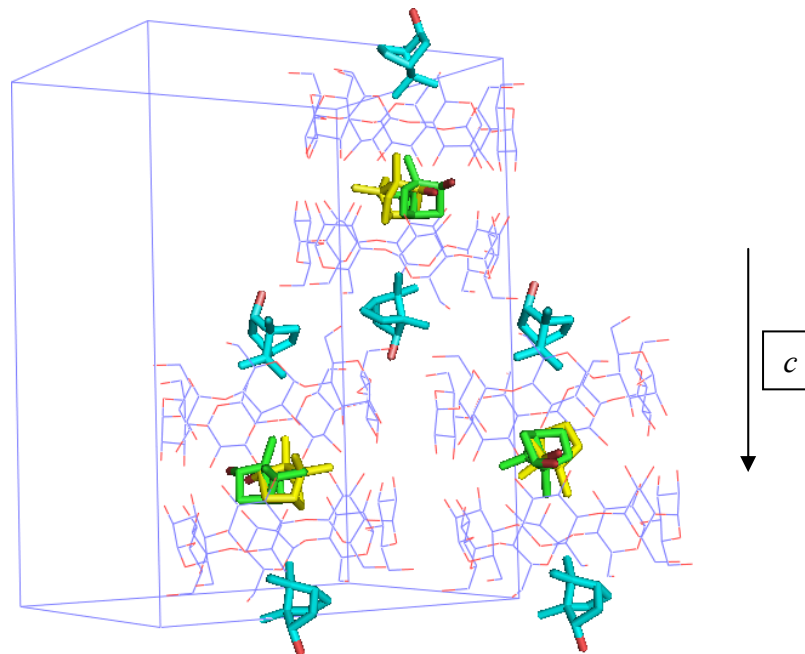
Τα $O4n$ άτομα της β -CD και στα δυο σύμπλοκα σχηματίζουν σχεδόν κανονικά επτάγωνα, με την απόσταση του κάθε $O4n$ ατόμου από το κεντρομερές τους να διαφέρει ελάχιστα. Επιπλέον, τα $O4n$ των β -CD είναι σχεδόν συνεπίπεδα και στις δυο περιπτώσεις αφού η μεγαλύτερη απόσταση από το μέσο τους επίπεδο είναι 0.057 \AA . Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι η διαμόρφωση των ξενιστών στα υπό μελέτη σύμπλοκα δεν έχουν υποστεί σημαντική παραμόρφωση, γεγονός που αποδίδεται στο σχήμα και μέγεθος των ξενιζόμενων μορίων.

Μόνο μια πρωτοταγής υδροξυλομάδα είναι αποδιατεταγμένη και όλες οι υδροξυλομάδες υιοθετούν την *gauche-gauche* διαμόρφωση και είναι τοποθετημένες προς το εξωτερικό της κοιλότητας του ξενιστή. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σπάνιο στα σύμπλοκα της β -CD και συνδέεται με την διευθέτηση των μεθυλομάδων (άτομα C8 και C9) στην περιοχή των πρωτοταγών υδροξυλίων, αλλά και τη συνολική διευθέτηση του ξενιζόμενου μορίου, που καταλαμβάνει τις θέσεις dA και IA. Αυτές οι θέσεις εντοπίζονται εκτός της κοιλότητας της β -CD προς το πρωτοταγές άκρο.

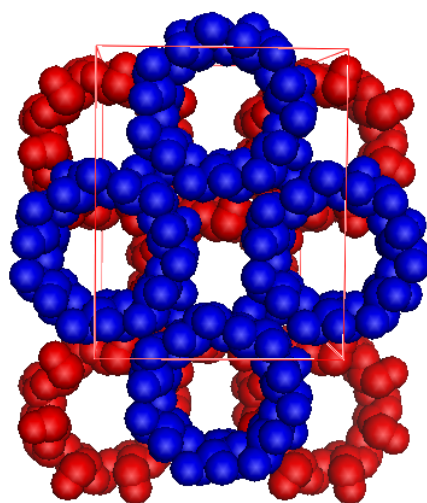
4.4.2.γ. Η κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση

Η μοριακή διευθέτηση και των δυο δομών είναι τύπου σκακιάρας (Σχήμα 4.7.α. και β.), όπως σε όλα τα διμερή σύμπλοκα της β -CD που κρυσταλλώνουν σε ομάδα χώρου $C222_1$. Τα διμερή των συμπλόκων φτιάχνουν ψευδο-κεντρικά παραμορφωμένα εξάγωνα σε στρώσεις, που συνδέονται με τον *b*-άξονα και τοποθετούνται κατά μήκος του *c*-άξονα. Τα στρώματα των διμερών δεν είναι παράλληλα με τα επίπεδα των $O4n$ ατόμων των διπλανών στρωμάτων, αλλά σχηματίζουν γωνίες 20.81° (*d*/ β -CD) ή 20.28° (*l*/ β -CD). Οι προβολές των κεντρομερών δυο γειτονικών διμερών τοποθετημένων κατά μήκος του *c*-άξονα στο *ab* επίπεδο των δυο δομών είναι παρόμοιες 8.95 \AA (*d*/ β -CD) και 8.94 \AA (*l*/ β -CD), και λίγο μεγαλύτερες από την μέση τιμή εκείνων των προβολών που παρατηρούνται στην μοριακή διευθέτηση τύπου σκακιάρας. Η τελευταία σταθεροποιείται με Η-δεσμούς που ενώνουν τα ξενιζόμενα μόρια εκτός της κοιλότητας με τα μόρια του ξενιστή στο γειτονικό διμερές κατά μήκος του *c*-άξονα. Ξενιστές και ξενιζόμενα μόρια συνδέονται άμεσα μέσω υδρογονικών δεσμών ή μέσω μορίων νερού που παρεμβάλλονται (Σχήμα 4.6.). Παρόμοιο δίκτυο Η-δεσμών που συνδέει το

ξενιζόμενο μόριο με το γειτονικό μόριο ξενιστή έχει επίσης παρατηρηθεί στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου 4-tert-butylbenzyl alcohol/ β -CD. Ο πίνακας 4.7. δίνει συνοπτικά την διαμόρφωση των μορίων ξενιστών στα σύμπλοκα της βορνεόλης με την β -CD.



(α)



(β)

Σχήμα 4.7.α. Η κρυσταλλική διεύθετηση των συμπλόκων d/β -CD κατά μήκος του άξονα c . Η κρυσταλλική διεύθετηση των διμερών των συμπλόκων d/β -CD χαρακτηρίζεται ως τύπου σκακιέρας.

Πίνακας 4.6. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών στα σύμπλοκα της βορνεόλης με την α -CD

Γλυκοζιτική μονάδα	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6
<i>d</i> / α -CD						
Μόριο A						
D _K (Å)	4.31	4.49	4.54	3.90	4.87	4.36
D(Å)	4.27	4.26	4.13	4.32	4.15	4.19
Φ_h (°)	124.6	121.2	114.3	123.9	121.4	114.6
<i>d</i> (Å)	0.007 (4)	-0.020 (4)	0.012 (4)	0.008 (4)	-0.021 (4)	0.013 (4)
τ (°)	13.75 (13)	13.05 (14)	13.37 (16)	11.3 (3)	15.7 (4)	12.2 (2)
<i>t</i> (°)	81.6 (11) a 52.7 (17) b	-55.6 (10)	68.6 (10)	67.7 (10)	96.7 (16) a -49.3 (17) b	-49.5 (11) a -82.6 (13) b
C	<i>gt</i> <i>gt</i>	<i>gg</i>	<i>gt</i>	<i>gt</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gg</i> <i>gg</i>
Μόριο B						
D _K (Å)	4.12	4.28	4.32	4.11	4.33	4.28
D(Å)	4.29	4.14	4.33	4.23	4.24	4.22
Φ_h (°)	122.8	119.2	117.4	124.0	117.1	119.1
<i>d</i> (Å)	0.028 (4)	0.094 (4)	-0.129 (4)	0.047 (4)	0.072 (4)	-0.110 (4)
τ (°)	13.6 (3)	12.3 (2)	15.85 (15)	14.72 (13)	14.16 (19)	15.1 (3(4))
<i>t</i> (°)	-62.9 (11)	74.9 (13)	64.6 (11) a -71.3 (12) b	-60.4 (10)	68 (2) a -62.3 (11) b	71.6 (12) a -70.9 (14) b
C	<i>gg</i>	<i>gt</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>

Γλυκοζιτική μονάδα	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6
<i>l/a</i> -CD						
Μόριο A						
D _K (Å)	4.22	4.43	4.14	4.20	4.45	4.10
D(Å)	4.28	4.14	4.43	4.14	4.27	4.28
Φ _h (°)	120.3	115.7	123.1	121.8	114.4	124.7
d (Å)	-0.014 (2)	0.021 (2)	-0.002 (2)	-0.018 (2)	0.025 (3)	0.009 (3)
τ (°)	13.06 (10)	10.94 (11)	12.90 (17)	15.7 (2)	12.22 (13)	14.38 (10)
t (°)	-55.3 (6)	64.5 (7)	73.5 (6) a 65.4 (7) b	-57.5 (12) a -35.8 (17) b 80.1 (18) c	-53.7 (8) a -62 (2) b	81.1 (8) a -59.2 (19) b 61.4 (14) c
C	<i>gg</i>	<i>gt</i>	<i>gt</i> <i>gt</i>	<i>gg</i> <i>gg</i> <i>gt</i>	<i>gg</i> <i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i> <i>gt</i>
Μόριο B						
D _K (Å)	4.35	4.33	4.15	4.29	4.36	4.13
D(Å)	4.29	4.25	4.32	4.19	4.35	4.26
Φ _h (°)	117.5	118.4	122.9	119.7	116.8	124.3
d (Å)	0.079 (2)	-0.111 (2)	0.027 (2)	0.090 (2)	-0.120 (2)	0.035 (2)
τ (°)	14.47 (11)	15.2 (19)	13.76 (19)	12.07 (12)	15.27 (08)	13.75 (07)
t (°)	-64.8 (7)	68.3 (8) a -71.2 (7) b	-63.1 (6)	69.8 (8) a -62.5 (18) b	72.0 (10) a -72.6 (10) b	-62.8 (6)
C	<i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gt</i> <i>gg</i>	<i>gg</i>

D_K = K...O4n; D = O4n...O4(n+1) αποστάσεις; Φ_h = O4(n-1)...O4n...O4(n+1) γωνίες; d = αποκλίσεις των O4n ατόμων από το μέσο επίπεδο ελαχίστων τετραγώνων; τ = κλίση των γωνιών μεταξύ του μέσου επιπέδου των ατόμων O4n και του μέσου επιπέδου των ατόμων O4(n-1), C1n, C4n, O4n; γωνίες συστροφής t = O5n-C5n-C6n-O6n, C = διαμόρφωση πρωτοταγών υδροξυλομάδων

Πίνακας 4.7. Διαμόρφωση των μορίων ξενιστών στα σύμπλοκα της βορνεόλης με την β-CD

Γλυκοζιτική μονάδα	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
<i>d</i> /β-CD							
D _K (Å)	5.061	4.950	4.943	5.057	4.970	4.969	4.958
D(Å)	4.292	4.386	4.299	4.315	4.320	4.319	4.346
Φ _h (°)	126.33	129.53	129.70	126.29	130.20	127.97	129.86
d (Å)	0.057	-0.023 (4)	-0.008 (4)	-0.013 (4)	0.044 (4)	-0.022 (4)	-0.036 (4)
	(5)						
τ (°)	8.9 (3)	6.1 (3)	12.28 (19)	9.68 (13)	9.08 (17)	5.19 (09)	2.59 (14)
t (°)	-54.2	-67.3 (9)	-73.8 (9)	-64.7 (9)	-65.9 (10)	-64.2 (9)	-62.4 (9)
	(9)						
C	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>
<i>l</i> /β-CD							
D _K (Å)	4.998	5.164	4.974	4.967	5.128	5.027	4.996
D(Å)	4.384	4.319	4.463	4.295	4.390	4.357	4.391
Φ _h (°)	130.39	125.02	130.02	130.19	126.10	129.44	128.57
d (Å)	0.016	-0.025 (5)	0.014 (4)	-0.002 (4)	0.004 (4)	-0.015 (4)	0.006 (4)
	(4)						
τ (°)	4.19	9.1 (3)	7.1 (3)	11.20 (19)	9.51 (13)	10.59 (16)	5.05 (9)
	(14)						
t (°)	-68.2	-49.7 (10)	65.0 (9)		-64.2 (9)	-69.0 (10)	-62.2 (10)
	(8)	-57.7 (14)		-71.1 (11)			
C	<i>gg</i>	<i>gg</i> <i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>

D_K = K...O4n; D = O4n...O4(n+1) αποστάσεις; Φ_h = O4(n-1)...O4n...O4(n+1) γωνίες; d = αποκλίσεις των O4n ατόμων από το μέσο επίπεδο ελαχίστων τετραγώνων; τ = κλίση των γωνιών μεταξύ του

μέσου επιπέδου των ατόμων $O4n$ και του μέσου επιπέδου των ατόμων $O4(n-1)$, $C1n$, $C4n$, $O4n$; γωνίες
συστροφής $t = O5n-C5n-C6n-O6n$, $C =$ διαμόρφωση πρωτοταγών υδροξυλομάδων

4.5. Συζήτηση

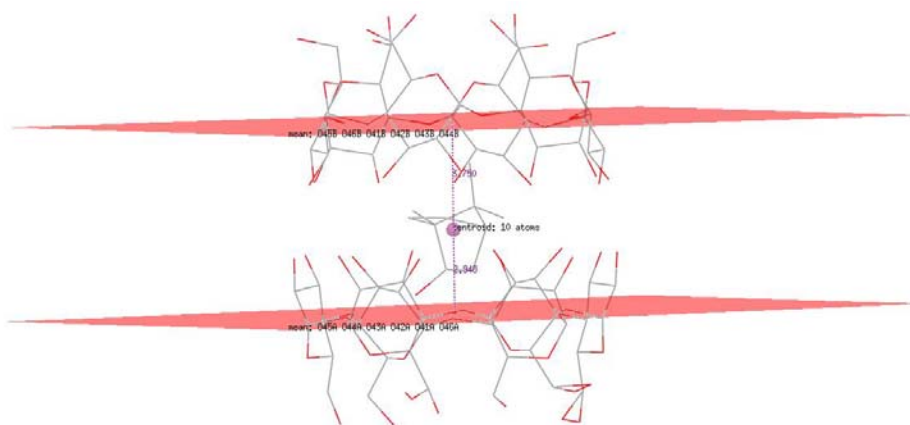
4.5.1. Συμπεράσματα

Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση που προηγήθηκε, παρατηρούμε αρχικά, ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη διαμόρφωση των μορίων ξενιστών στα σύμπλοκα με διαφορετικό ξενιζόμενο εναντιομερές της βορνεόλης. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς στις περισσότερες μελέτες εγκλεισμού εναντιομερών σε φυσικές κυκλοδεξτρίνες παρατηρείται ασθενής διαφοροποίηση (Grandeur et al., 2003) (Grandeur et al., 2007) εξαιτίας της ακαμψίας των μορίων-ξενιστών που οφείλεται με την σειρά της στο ενδομοριακό δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Η πιθανότητα να προσαρμόσουν τη διαμόρφωσή τους οι σχετικά άκαμπτες φυσικές κυκλοδεξτρίνες έτσι ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο ταίριασμα (induced-fit) με το ξενιζόμενο μόριο, είναι μικρή. Για αυτό το λόγο στην προσπάθεια να ενισχυθεί η διαφοροποίηση τέτοιων συμπλόκων εναντιομερών χρησιμοποιούνται κατάλληλα τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (Voskuhl et al., 2011)(Y. Liu et al., 2007)(Su et al., 2012) (Grandeur et al., 2007)

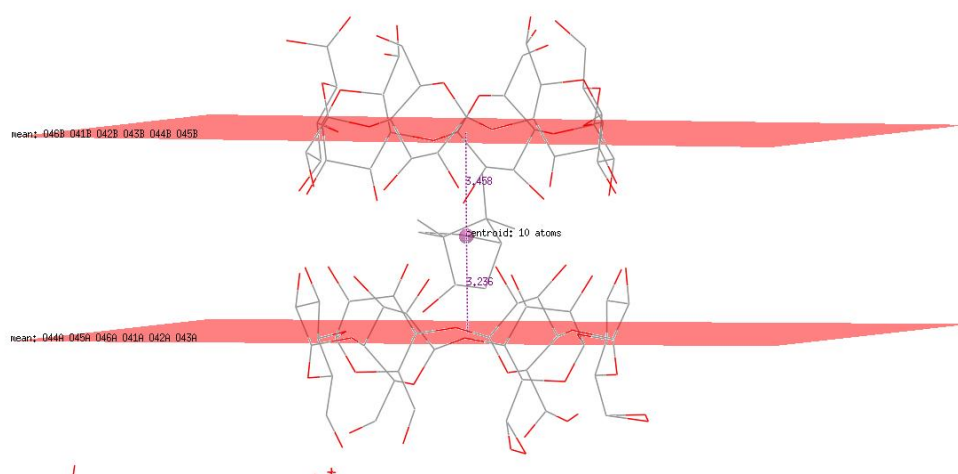
Όσον αφορά τα σύμπλοκα των εναντιομερών της βορνεόλης σε α -CD, παρατηρείται η ίδια γεωμετρία εγκλεισμού και η ίδια κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση. Συγκεκριμένα και στις δύο περιπτώσεις (d/α -CD και l/α -CD) σχηματίζεται διμερές α -CD τύπου κεφαλής-κεφαλής, στου οποίου τη σχηματιζόμενη κοιλότητα εγκλείεται ένα ξενιζόμενο μόριο (2:1 στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζομένου). Η κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση χαρακτηρίζεται ως τύπου «σκακιέρας» αν και οι αποστάσεις των προβολών των κεντρομερών των διμερών από δυο διαδοχικές στρώσεις στο ab επίπεδο είναι πολύ μικρότερες σε σύγκριση με εκείνες των συμπλόκων των β -CD, στις οποίες αναφέρεται ο συγκεκριμένος τύπος κρυσταλλικής μοριακής διεύθυνσης (Mentzafos et al., 1991). Παρόμοια γεωμετρία εγκλεισμού και κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση παρατηρείται και στα σύμπλοκά των εναντιομερών της καμφοράς σε α -CD (Kokkinou et al., 2010), γεγονός αναμενόμενο βάσει της ομοιότητας του σχήματος και του μεγέθους των ξενιζόμενων μορίων.

Στο σύμπλοκο d/α -CD, το ξενιζόμενο μόριο βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε δύο θέσεις, dA (αριθμός κατάληψης 80% και μέσος παράγοντας θερμικής κίνησης $B_A = 0.087$) και dB (αριθμός κατάληψης 20% και $B_B = 0.122$). Οι δύο αυτές θέσεις είναι πολύ κοντινές και όπως φαίνεται από το σχήμα 4.3.α., η μία προκύπτει από την άλλη

με μια μικρή στροφή και μετατόπιση. Βρίσκονται ενθυλακωμένες στο μεσοδιάστημα του διμερούς (απόστασεις των κεντρομερών από τα μέσα επίπεδα των O4n των α -CD: (i) για dA: 3.7Å και 2.9Å, σχήμα 4.8.α. (ii) για dB: 3.5Å και 3.2Å, σχήμα 4.8.β.), πολύ κοντά η μια στην άλλη (απόσταση κεντρομερών dA-dB: 0.45Å) και έχουν τον ίδιο προσανατολισμό όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.4.1.α.



(α)



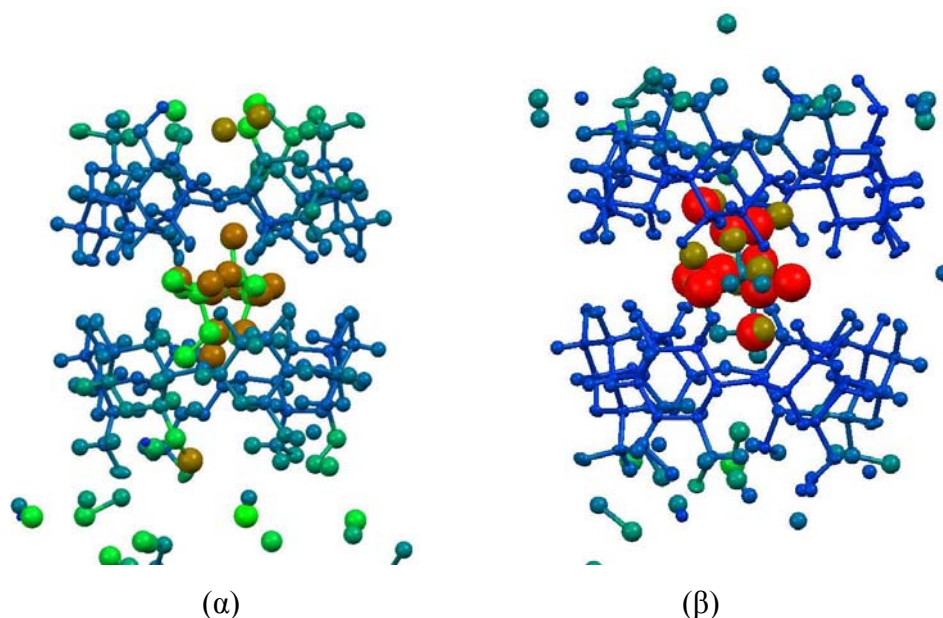
(β)

Σχήμα 4.8.α. Οι απόστασεις του κεντρομερούς της θέσης dA του συμπλόκου d/α -CD από τα μέσα επίπεδα των O4n των α -CD είναι 3.7 και 2.9Å, αντίστοιχα και **β.** Οι απόστασεις του κεντρομερούς της θέσης dB του ίδιου συμπλόκου από τα μέσα επίπεδα των O4n των α -CD είναι 3.5 και 3.2Å, αντίστοιχα

Η μέση τιμή του παράγοντα θερμικής κίνησης για το εγκλεισμένο μόριο της *d*-βορνεόλης που καταλαμβάνει τις δύο αυτές θέσεις υπολογίζεται $B_{\text{overall}} = 0.094$.

Από την άλλη πλευρά, στο σύμπλοκο *l*/ α -CD, το ξενιζόμενο μόριο της *l*-βορνεόλης βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε 3 θέσεις: 1A (με αριθμό κατάληψης 60% και $B_A = 0.045$), 1B (με αριθμό κατάληψης 20% και $B_B = 0.196$) και 1C (με αριθμό κατάληψης 20% και $B_C = 0.105$). Και οι τρεις αυτές θέσεις βρίσκονται στο μεσοδιάστημα της κοιλότητας του διμερούς όπως και στο *d*/ α -CD σύμπλοκο (ίδια γεωμετρία εγκλεισμού) αλλά διαφοροποιούνται σε σχέση με την ξενιζόμενη *d*-βορνεόλη στα εξής σημεία: Ενώ οι θέσεις 1B και 1C εντοπίζονται κοντά η μία στην άλλη (απόσταση κεντρομερών 1B-1C: 0.42Å), η θέση 1A είναι πιο απομακρυσμένη (απόσταση κεντρομερών 1A-1B: 1.05Å και 1A-1C: 1.14Å). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4.1., ο προσανατολισμός της θέσης 1A είναι αντιδιαμετρικά αντίθετος σε σχέση με αυτόν της 1B ενώ διαφοροποιείται αρκετά και σε σχέση με αυτόν της 1C (Σχήμα 4.3.β. και γ.). Οι θέσεις 1B και 1C χαρακτηρίζονται από χαμηλό αριθμό κατάληψης και υψηλό παράγοντα θερμικής κίνησης και δεδομένου του σχήματος του ξενιζομένου μορίου αποτελούν μια συμβιβαστική προσέγγιση απόδοσης ατομικών κορυφών στη «σφαιρική» κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που παρατηρείται στην κοιλότητα του διμερούς. Παρ' όλα αυτά μπορούμε να πούμε με σχετική ασφάλεια ότι στην περίπτωση του ξενιζομένου μορίου της *l*-βορνεόλης σε α -CD, αυτό έχει την ικανότητα να αποδιατάσσεται περισσότερο από ότι η ξενιζόμενη *d*-βορνεόλη σε α -CD καταλαμβάνοντας θέσεις που απέχουν μεταξύ τους και παρουσιάζουν διαφορετικό προσανατολισμό. Η μέση τιμή του παράγοντα θερμικής κίνησης για τις 3 θέσεις της *l*-βορνεόλης υπολογίζεται $B_{\text{overall}} = 0.126$. Η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της *d*-βορνεόλης και η διαφορά στη θερμική κίνηση φαίνεται στο σχήμα 4.9.α. και β., όπου αποδίδονται χρωματικά οι ατομικές θέσεις σύμφωνα με την τιμή του παράγοντα θερμικής κίνησης που τις χαρακτηρίζει (από ερυθρό για τις υψηλότερες έως ιώδες για τις χαμηλότερες τιμές του παράγοντα B). Συγκρίνοντας τα σχήματα αυτά, είναι εμφανής η εντονότερη θερμική κίνηση που παρατηρείται για το εγκλεισμένο μόριο στο σύμπλοκο *l*/ α -CD σχετικά με αυτό στο *d*/ α -CD. Για τη σύγκριση αυτή θα πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί αφού πρόκειται για δύο διαφορετικούς κρυστάλλους. Γνωρίζουμε ότι η ποιότητα του κρυστάλλου, η ποιότητα των δεδομένων περίθλασης και η θερμοκρασία παίζουν μεγάλο ρόλο στον υπολογισμό

της θερμικής κίνησης της κρυσταλλικής δομής. Στην περίπτωση μας, η συλλογή δεδομένων έγινε για όλους τους κρυστάλλους με ακτινοβολία ίδιας έντασης και μήκους κύματος, και στην ίδια θερμοκρασία (100 K). Μάλιστα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τον κρύσταλλο του *l*/ α -CD συμπλόκου ήταν σε υψηλότερη διακριτότητα. Επίσης, αν συγκρίνουμε τους ατομικούς παράγοντες θερμικής κίνησης των α -CDs σε αυτές τις δομές θα δούμε ότι δεν διαφέρουν σημαντικά (με αυτούς του *l*/ α -CD συμπλόκου να είναι χαμηλότεροι) και επομένως, μπορούμε να διατυπώσουμε το συμπέρασμα ότι στην κρυσταλλική κατάσταση, η ξενιζόμενη *l*-βορνεόλη εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα από την *d*-βορνεόλη. Σύμφωνα με αυτό αναμένουμε από κατάλληλα πειράματα να δείξουν ότι η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου *l*/ α -CD είναι μικρότερη από αυτή του *d*/ α -CD.

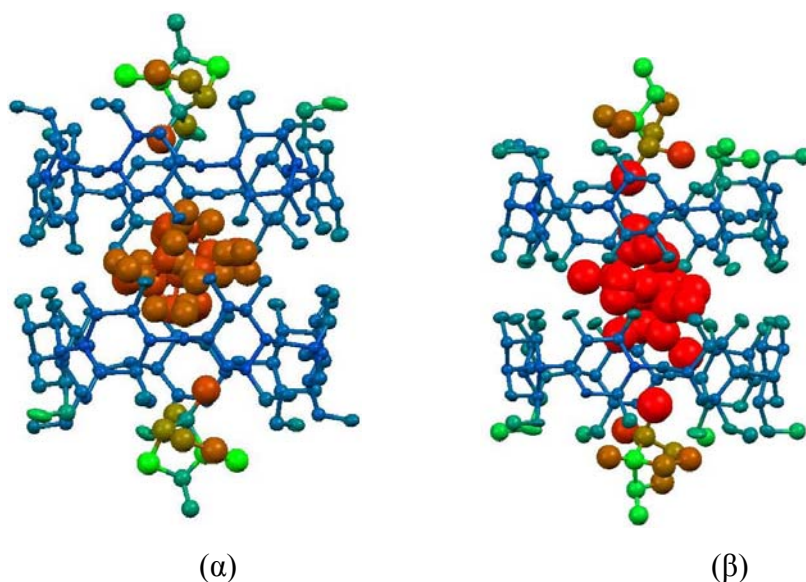


Σχήμα 4.9.α. Οι ατομικές θέσεις του συμπλόκου *d*/ α CD χρωματισμένες σύμφωνα με την τιμή του παράγοντα B (από ερυθρό για τις υψηλότερες έως ιώδες για τις χαμηλότερες τιμές του παράγοντα B) **β.** Ομοίως για το σύμπλοκο *l*/ α CD.

Όσον αφορά τα σύμπλοκα της β -CD, επίσης δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση, στην γεωμετρία εγκλεισμού και στην κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση. Συγκεκριμένα και στις δύο περιπτώσεις (*d*/ β CD και *l*/ β CD), η στοιχειομετρία ξενιστή προς ξενιζόμενο μόριο είναι 2:3, με ένα ξενιζόμενο μόριο, να βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε δυο θέσεις στην κοιλότητα που σχηματίζει το διμερές της β -CD και δυο ξενιζόμενα μόρια να εντοπίζονται στα πρωτοταγή άκρα του διμερούς. Η κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση χαρακτηρίζεται ως τύπου σκακιέρας

και η απόσταση των προβολών των κεντρομερών από δυο διμερή διαδοχικών στρώσεων στο *ab* επίπεδο είναι πολύ κοντά στο μέσο όρο εκείνου για τις δομές που κρυσταλλώνουν σε ομάδα χώρου $C222_1$.

Στο σύμπλοκο d/β -CD, η εξωτερική θέση dA εμφανίζει μέσο παράγοντα θερμικής κίνησης ($B_A = 0.096$) μικρότερο από εκείνον της θέσης 1A ($B_A = 0.130$) του συμπλόκου l/β -CD, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρότερη αλληλεπίδραση του «εξωτερικού» μορίου της *d*-βορνεόλης με τις γειτονικές β -CDs, από το αντίστοιχο της *l*-βορνεόλης (σχήμα 4.10.α. και β.). Παρόλο που αυτό το μόριο της βορνεόλης συμμετέχει στις κρυσταλλικές επαφές με τον ίδιο τρόπο (δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας της και εκείνης της πρωτοταγούς πλευράς γειτονικής β -CD ή μορίου νερού, σχήμα 4.6.α. και β.) δεν παρατηρούνται διαφορές στην κρυσταλλική διευθέτιση των δυο συμπλόκων των εναντιομερών. Παράλληλα, το εγκλεισμένο ξενιζόμενο μόριο στο σύμπλοκο d/β -CD βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε δύο θέσεις, dB (αριθμός κατάληψης 20% και μέσος παράγοντας θερμικής κίνησης $B_B = 0.154$) και dC (αριθμός κατάληψης 30% και $B_C = 0.133$). Από την άλλη πλευρά, το εγκλεισμένο ξενιζόμενο μόριο στο σύμπλοκο l/β -CD, 1B εμφανίζει αριθμό κατάληψης 50% και μέσο παράγοντα θερμικής κίνησης $B_B = 0.269$ (σχήμα 4.10.α. και β.). Και στις δυο περιπτώσεις, ο συνολικός αριθμός κατάληψης του μορίου της βορνεόλης, που περικλείεται μέσα στην κοιλότητα του διμερούς της β -CD είναι 1.00, εάν συνυπολογίσουμε και την συμμετρία της ομάδας χώρου.



Σχήμα 4.10.α. Οι ατομικές θέσεις του συμπλόκου d/β CD χρωματισμένες σύμφωνα με την τιμή του παράγοντα B (ερυθρό για τις υψηλότερες έως ιώδες για τις χαμηλότερες τιμές του παράγοντα B) β. Ομοίως για το σύμπλοκο l/β CD.

Η μέση τιμή του παράγοντα θερμικής κίνησης για τις 2 «εσωτερικές» θέσεις της *d*-βορνεόλης υπολογίζεται $B_{\text{overall}} = 0.141$. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη της *l*-βορνεόλης για το εγκλεισμένο μόριο. (σχήμα 4.11.α. και β.). Από την σύγκριση των σχημάτων αυτών φαίνεται εντονότερη θερμική κίνηση για το εγκλεισμένο μόριο στο σύμπλοκο *l*/ β -CD σε σχέση με αυτό στο *d*/ β -CD. Και σε αυτήν την περίπτωση θα πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί αφού πρόκειται για δύο διαφορετικούς κρυστάλλους, παρόλο που η συλλογή δεδομένων έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες. Επίσης, από την σύγκριση των ατομικών παραγόντων θερμικής κίνησης των β -CDs σε αυτές τις δομές δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές και επομένως μπορούμε να διατυπώσουμε το συμπέρασμα ότι στην κρυσταλλική κατάσταση η ξενιζόμενη *l*-βορνεόλη εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα από την *d*-βορνεόλη. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με αποτελέσματα θερμοδυναμικής μελέτης (ITC) με την οποία υπολογίστηκαν η σταθερές σύνδεσης του συμπλόκου *l*/ β -CD ίση με 1.28×10^4 (M^{-1}) και του *d*/ β -CD ίση με 2.00×10^4 (M^{-1}) (Voskuhl et al., 2011). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου *d*/ β -CD υπολογισμένη με την μέθοδο των Higuchi-Connors (Su et al., 2012) βρέθηκε ίση με 3.88×10^4 (M^{-1}), γεγονός που μαρτυρά πως ο καθορισμός της τελικής τιμής της σταθεράς σύνδεσης εξαρτάται και από την ακρίβεια της χρησιμοποιούμενης μεθόδου. Σε κάθε περίπτωση όμως, η *l*-βορνεόλη παρουσιάζεται περισσότερο ευκίνητη στην κοιλότητα τόσο της α -CD όσο και της β -CD. Τέλος, τα σύμπλοκα (*d,l*)/ α -CD με βάση την τιμή του παράγοντα θερμικής κίνησης *B* εμφανίζονται πιο σταθερά σε σχέση με τα σύμπλοκα (*d,l*)/ β -CD, γεγονός αναμενόμενο λόγω της μικρότερης κοιλότητας των α -CDs. Πειράματα θερμοδυναμικής μελέτης των (*d,l*)/ α -CD συμπλόκων και καθορισμός της σταθεράς σύνδεσης *K*_s μπορεί να αποσαφηνίσουν την ικανότητα ή μη της α -CD για χειρόμορφη αναγνώριση των εναντιομερών της βορνεόλης ή/και να προτείνουν χημικές τροποποιήσεις της που ενισχύουν τον διαχωρισμό.

Βιβλιογραφία

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., ... Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 2), 213–221.
- Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(3), 266–272. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.028
- Bellringer, M. E., Smith, T. G., Read, R., Gopinath, C., & Olivier, P. (1995). β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. *Food and Chemical Toxicology*, 33(5), 367 – 376. doi:10.1016/0278-6915(94)00149-I
- Bethanis, K., Tzamalīs, P., Tsorteki, F., Kokkinou, A., Christoforides, E., & Mentzafos, D. (2012). Structural study of the inclusion compounds of thymol, carvacrol and eugenol in β -cyclodextrin by X-ray crystallography. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 1–11. doi:10.1007/s10847-012-0230-9
- Beurskens P.T., Beurskens G., de Gelder R., Garcia-Granda S., Gould R.O., and Smits J.M.M. (2008). The DIRDIF2008 program system, Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., ... Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 54(Pt 5), 905–921.
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), E329–357. doi:10.1208/pt060243
- Chen, Q., Ma, C., Wang, W., & Yu, M. (2005). [Analysis of volatile constituents from *Anemarrhena asphodeloides* by GC-MS]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 30(21), 1657–1659.
- Chen, Vincent B, Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica*.

- Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 1), 12–21.
doi:10.1107/S0907444909042073
- Christoforides, E., Dimou, M., Katinakis, P., Bethanis, K., & Karpusas, M. (2012). Structure of a bacterial cytoplasmic cyclophilin A in complex with a tetrapeptide. *Acta Crystallographica Section F*, 68(3), 259–264.
doi:10.1107/S1744309112000188
- Clubb, R. T., Ferguson, S. B., Walsh, C. T., & Wagner, G. (1994). Three-dimensional solution structure of Escherichia coli periplasmic cyclophilin. *Biochemistry*, 33(10), 2761–2772.
- Dimou, M., Venieraki, A., Liakopoulos, G., & Katinakis, P. (2010). Cloning, characterization and transcriptional analysis of two phosphate acetyltransferase isoforms from Azotobacter vinelandii. *Molecular biology reports*.
- Dimou, M., Venieraki, A., Liakopoulos, G., Kouri, E. D., Tampakaki, A., & Katinakis, P. (2011). Gene Expression and Biochemical Characterization of Azotobacter vinelandii Cyclophilins and Protein Interaction Studies of the Cytoplasmic Isoform with dnaK and lpxH. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 176–190.
- Edwards, K. J., Ollis, D. L., & Dixon, N. E. (1997). Crystal structure of cytoplasmic Escherichia coli peptidyl-prolyl isomerase: evidence for decreased mobility of loops upon complexation. *Journal of Molecular Biology*, 271(2), 258–265.
- Eisenmesser, E. Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D. A., ... Kern, D. (2005). Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 438(7064), 117–121.
- Ellis, P. J., Carlow, C. K., Ma, D., & Kuhn, P. (2000). Crystal structure of the complex of brugia malayi cyclophilin and cyclosporin A. *Biochemistry*, 39(3), 592–598.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics *Acta Cryst. D*60, 2126-2132.
- Farrugia, L. J. (1999). It WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *Journal of Applied Crystallography*, 32(4), 837–838.
doi:10.1107/S0021889899006020

- Fraser, J. S., Clarkson, M. W., Degnan, S. C., Erion, R., Kern, D., & Alber, T. (2009). Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis. *Nature*, *462*(7273), 669–673.
- Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D. K., Houseweart, M., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (1996). Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*, *87*(7), 1285–1294.
- Glaser, A. G., Limacher, A., Flückiger, S., Scheynius, A., Scapozza, L., & Cramer, R. (2006). Analysis of the cross-reactivity and of the 1.5 Å crystal structure of the *Malassezia sympodialis* Malas 6 allergen, a member of the cyclophilin pan-allergen family. *Biochem J*, *396*(1), 41–49. doi:10.1042/BJ20051708
- Gothel, S. F., & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and molecular life sciences*: *CMLS*, *55*(3), 423–436.
- Gouet, P., Robert, X., & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3320–3323.
- Gourlay, L. J., Angelucci, F., Baiocco, P., Boumis, G., Brunori, M., Bellelli, A., & Miele, A. E. (2007). The Three-dimensional Structure of Two Redox States of Cyclophilin A from *Schistosoma mansoni*: EVIDENCE FOR REDOX REGULATION OF PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(34), 24851–24857. doi:10.1074/jbc.M702714200
- Grandeury, A., Condamine, E., Hilfert, L., Gouhier, G., Petit, S., & Coquerel, G. (2007). Chiral discrimination in host-guest supramolecular complexes. Understanding enantioselectivity and solid solution behaviors by using spectroscopic methods and chemical sensors. *The journal of physical chemistry. B*, *111*(25), 7017–7026. doi:10.1021/jp071428o
- Grandeury, A., Petit, S., Gouhier, G., Agasse, V., & Coquerel G., (2003). Enantioseparation of 1-(p-bromophenyl)ethanol by crystallization of host-guest complexes with permethylated beta-cyclodextrin: crystal structures and mechanisms of chiral recognition. *Tetrahedron: Asymmetry*, *14*(15), 2143–2152. doi:doi:10.1016/S0957-4166(03)00360-4
- Granger, R. E., Campbell, E. L., & Johnston, G. A. R. (2005). (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant

- alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors. *Biochemical Pharmacology*, 69(7), 1101–1111. doi:10.1016/j.bcp.2005.01.002
- Guo, M., Zhang, S., Song, F., Wang, D., Liu, Z., & Liu, S. (2003). Studies on the non-covalent complexes between oleanolic acid and cyclodextrins using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*, 38(7), 723–731. doi:10.1002/jms.486
- Harata, K., & Kawano, K. (2002). Crystal structure of the cyclomaltohexaose (alpha-cyclodextrin) complex with isosorbide dinitrate. Guest-modulated channel-type structure. *Carbohydrate Research*, 337(6), 537–547.
- Harrar, Y., Bellini, C., & Faure, J. D. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in plant science*, 6(9), 426–431.
- He, H., Shen, Q., & Li, J. (2011). Effects of borneol on the intestinal transport and absorption of two P-glycoprotein substrates in rats. *Archives of pharmacal research*, 34(7), 1161–1170. doi:10.1007/s12272-011-0714-y
- Henriksson, L. M., Johansson, P., Unge, T., & Mowbray, S. L. (2004). X-ray structure of peptidyl-prolyl cis–trans isomerase A from Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Biochemistry*, 271(20), 4107–4113. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04348.x
- Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Molecular biotechnology*, 3(2), 93–99. doi:10.1007/BF02789105
- Howard, B. R., Vajdos, F. F., Li, S., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (2003). Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nature structural biology*, 10(6), 475–481.
- Huang, L. L., Zhao, X. M., Huang, C. Q., Yu, L., & Xia, Z. X. (2005). Structure of recombinant human cyclophilin J, a novel member of the cyclophilin family. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61(Pt 3), 316–321. doi:10.1107/S0907444904033189
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–8, 27–8.
- Kabsch, W. (2010). *it* XDS. *Acta Crystallographica Section D*, 66(2), 125–132. doi:10.1107/S0907444909047337
- Kantardjieff, K. A., & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid

- complex crystals. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12(9), 1865–1871. doi:10.1110/ps.0350503
- Ke, H., Mayrose, D., Belshaw, P. J., Alberg, D. G., Schreiber, S. L., Chang, Z. Y., ... Walsh, C. T. (1994). Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A. *Structure (London, England: 1993)*, 2(1), 33–44.
- Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E., & Rich, D. H. (1991). Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*, 30(25), 6127–6134. doi:10.1021/bi00239a007
- Kokkinou, A., Tsorteki, F., Karpusas, M., Papakyriakou, A., Bethanis, K., & Mentzafos, D. (2010). Study of the inclusion of the (R)- and (S)-camphor enantiomers in alpha-cyclodextrin by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Carbohydrate research*, 345(8), 1034–1040.
- Konno, M., Ito, M., Hayano, T., & Takahashi, N. (1996). The substrate-binding site in Escherichia coli cyclophilin A preferably recognizes a cis-proline isomer or a highly distorted form of the trans isomer. *Journal of Molecular Biology*, 256(5), 897–908.
- Konno, M., Sano, Y., Okudaira, K., Kawaguchi, Y., Yamagishi-Ohmori, Y., Fushinobu, S., & Matsuzawa, H. (2004). Escherichia coli cyclophilin B binds a highly distorted form of trans-prolyl peptide isomer. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(18), 3794–3803.
- Kumar, S., Prahalthan, P., & Raja, B. (2011). Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. *Redox report: communications in free radical research*, 16(5), 208–215. doi:10.1179/1351000211Y.0000000009
- Laskowski, R. A., & MacArthur, M. W., (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*; 26(2):283-291
- Leslie, A. W., & Powell, H. (2007). Processing diffraction data with mosflm. In R. Read & J. Sussman (Eds.), *Evolving Methods for Macromolecular*

- Crystallography* (Vol. 245, pp. 41–51). Springer Netherlands. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6316-9_4
- Lina, B. A. R., & Bär, A. (2004). Subchronic (13-week) oral toxicity study of alpha-cyclodextrin in dogs. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 39 Suppl 1, S27–33. doi:10.1016/j.yrtph.2004.05.005
- Liu, L., & Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 42(1-2), 1–14. doi:10.1023/A:1014520830813
- Liu, Y., Zhang, Q., & Chen, Y. (2007). Spectrophotometric and calorimetric titration studies on molecular recognition of camphor and borneol by nucleobase-modified beta-cyclodextrins. *The journal of physical chemistry. B*, 111(42), 12211–12218. doi:10.1021/jp072940c
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2011). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(9), 1119–1135. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01279.x
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., ... Wood, P. A. (2008). Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, 41(2), 466–470. doi:10.1107/S0021889807067908
- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313–326. doi:10.1002/ffj.2019
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, 40(Pt 4), 658–674. doi:10.1107/S0021889807021206
- McPherson, A. (2009). *Introduction to Macromolecular Crystallography*. Wiley. Retrieved from http://books.google.gr/books?id=pfGBoHB_1ZAC
- Mentzafos, D., Mavridis, I. M., Le Bas, G., & Tsoucaris, G. (1991). Structure of the 4-tert-butylbenzyl alcohol- β -cyclodextrin complex. Common features in the geometry of β -cyclodextrin dimeric complexes. *Acta Crystallographica Section B*, 47(5), 746–757. doi:10.1107/S010876819100366X

- Mikol, V., Rodeau, J. L., & Giegé, R. (1990). Experimental determination of water equilibration rates in the hanging drop method of protein crystallization. *Analytical biochemistry*, *186*(2), 332–339.
- Opdyke, D. L. (1975). Monographs on fragrance raw materials. *Food and cosmetics toxicology*, *13*(4), 449–457.
- Otwinowski, Z., & Minor, W. (1997). [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 276, pp. 307–326). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668799776066X>
- Picken, N. C., Eschenlauer, S., Taylor, P., Page, A. P., & Walkinshaw, M. D. (2002). Structural and biological characterisation of the gut-associated cyclophilin B isoforms from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, *322*(1), 15–25.
- Ramachandran, G. N., & Mitra, A. K. (1976). An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, *107*(1), 85–92.
- Rediers, H., Vanderleyden, J., & De Mot, R. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, *150*(5), 1117–1119. doi:10.1099/mic.0.27096-0
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, *39*(4), 516–539.
- Schlatter, D., Thoma, R., Küng, E., Stihle, M., Müller, F., Borroni, E., ... Hennig, M. (2005). Crystal engineering yields crystals of cyclophilin D diffracting to 1.7 Å resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, *61*(Pt 5), 513–519. doi:10.1107/S0907444905003070
- Schüttelkopf, A. W., & Van Aalten, D. M. F. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, *60*(Pt 8), 1355–1363. doi:10.1107/S0907444904011679
- Sen, B., Venugopal, V., Chakraborty, A., Datta, R., Dolai, S., Banerjee, R., & Datta, A. K. (2007). Amino acid residues of *Leishmania donovani* cyclophilin key to interaction with its adenosine kinase: biological implications. *Biochemistry*, *46*(26), 7832–7843. doi:10.1021/bi602625h

- Sheldrick, G. M. (2008). A short history of it SHELX. *Acta Crystallographica Section A*, 64(1), 112–122. doi:10.1107/S0108767307043930
- Spek, A. L. (2009). Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, 65(2), 148–155. doi:10.1107/S090744490804362X
- Su, J., Chen, J., Li, L., Li, B., Shi, L., Chen, L., & Xu, Z. (2012). Formation of β -cyclodextrin inclusion enhances the stability and aqueous solubility of natural borneol. *Journal of food science*, 77(6), C658–664. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02713.x
- Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins in Pesticides. *Starch - Stärke*, 37(11), 382–386. doi:10.1002/star.19850371106
- Til, H. P., & Bär, A. (1998). Subchronic (13-week) oral toxicity study of gamma-cyclodextrin in dogs. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 27(2), 159–165. doi:10.1006/rtp.1998.1220
- Trapani, S., & Navaza, J. (2008). AMoRe: classical and modern. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 64(Pt 1), 11–16.
- Triantafyllopoulou, V., Tsorteki, F., Mentzafos, D., & Bethanis, K. (2012). Inclusion compounds of plant growth regulators in cyclodextrins, part VII: study of the crystal structures of 2-naphthylacetic acid encapsulated in β -cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin complexes by X-ray crystallography. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 1–8. doi:10.1007/s10847-012-0164-2
- Trzesniak, D., & Van Gunsteren, W. F. (2006). Catalytic mechanism of cyclophilin as observed in molecular dynamics simulations: pathway prediction and reconciliation of X-ray crystallographic and NMR solution data. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 15(11), 2544–2551. doi:10.1110/ps.062356406
- Vajdos, F. F., Yoo, S., Houseweart, M., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (1997). Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 6(11), 2297–2307. doi:10.1002/pro.5560061103
- Venugopal, V., Sen, B., Datta, A. K., & Banerjee, R. (2007). Structure of cyclophilin from *Leishmania donovani* at 1.97 Å resolution. *Acta*

- crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 63(Pt 2), 60–64.
- Voskuhl, J., Schaepe, K., & Ravoo, B. J. (2011). Enhanced chiral recognition by cyclodextrin dimers. *International journal of molecular sciences*, 12(7), 4637–4646. doi:10.3390/ijms12074637
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering*, 8(2), 127–134.
- Wang, P., & Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome biology*, 6(7), 226.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., ... Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 4), 235–242. doi:10.1107/S0907444910045749
- Wu, C., Huang, Q., Qi, H., Guo, P., & Hou, S. (2006). Promoting effect of borneol on the permeability of puerarin eye drops and timolol maleate eye drops through the cornea in vitro. *Die Pharmazie*, 61(9), 783–788.
- Zhao, Y., & Ke, H. (1996). Mechanistic implication of crystal structures of the cyclophilin-dipeptide complexes. *Biochemistry*, 35(23), 7362–7368.
- Zhao, Yingdong, & Ke, H. (1996). Crystal Structure Implies That Cyclophilin Predominantly Catalyzes the Trans to Cis Isomerization†,‡. *Biochemistry*, 35(23), 7356–7361. doi:10.1021/bi9602775
- Σαμαράς, Γ. Χ., (2008). Μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού D-βορνεόλης σε α-κυκλοδεξτρίνη. *Μεταπτυχιακή Διατριβή Γ.Π.Α.*
- Χατζηπέρος, Ν. Π., (2010). Δομική μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X του προϊόντος εγκλεισμού της βορνεόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη. *Μεταπτυχιακή Διατριβή Γ.Π.Α.*