

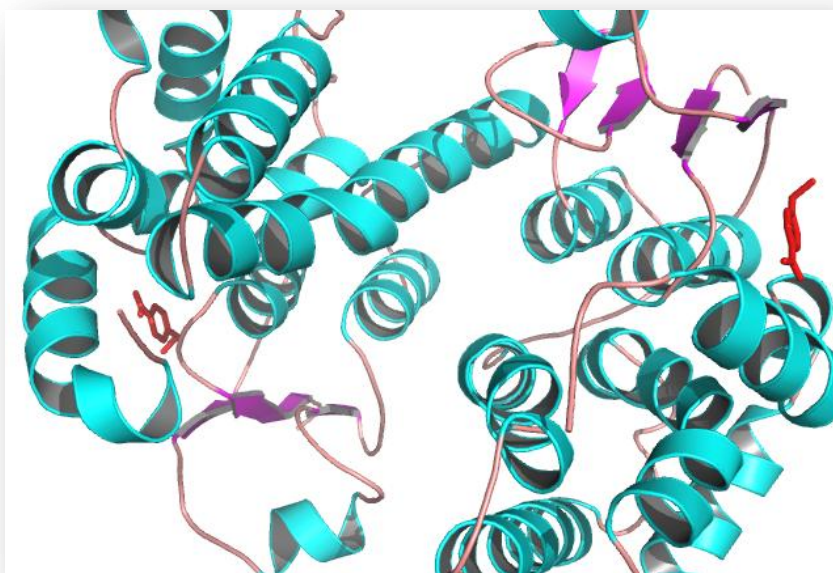


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ>>
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:
ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ
hGSTA1-1



ΜΑΡΙΑΝΝΑ Γ. ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Μ. Καπούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής, ΓΠΑ.

ΑΘΗΝΑ 2012

Γ Ε Ω Π Ο Ν Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν
Γ Ε Ν Ι Κ Ο Τ Μ Η Μ Α , Ε Ρ Γ Α Σ Τ Η Ρ Ι Ο Φ Υ Σ Ι Κ Η Σ

Π Ρ Ο Γ Ρ Α Μ Μ Α Μ Ε Τ Α Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Ω Ν Σ Π Ο Υ Δ Ω Ν
«Θ Ε Τ Ι Κ Ε Σ Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ε Σ Σ Τ Η Γ Ε Ω Π Ο Ν Ι Α»
Κ Λ Α Δ Ο Σ Ι Ι : Μ Ε Λ Ε Τ Η Κ Α Ι Α Ξ Ι Ο Π Ο Ι Η Σ Η Φ Υ Σ Ι Κ Ω Ν Π Ρ Ο Ϊ Ο Ν Τ Ω Ν

Μ Ε Τ Α Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

Θ Ε Μ Α :
Μ Ε Λ Ε Τ Η Α Λ Λ Η Λ Ε Π Ι Δ Ρ Α Σ Η Σ Κ Υ Κ Λ Ο Δ Ε Ξ Τ Ρ Ι Ν Ω Ν Μ Ε Τ Ο
Ε Ν Ζ Υ Μ Ο hG S T A 1 - 1

Μ Α Ρ Ι Α Ν Ν Α Γ . Χ Α Τ Ζ Η Κ Ω Ν Σ Τ Α Ν Τ Ι Ν Ο Υ
Γ Ε Ω Π Ο Ν Ο Σ Β Ι Ο Τ Ε Χ Ν Ο Λ Ο Γ Ο Σ

Επιβλέπων καθηγητής: Μ. Καρούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής, ΓΠΑ.

ΑΘΗΝΑ 2012

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΤΟ
ΕΝΖΥΜΟ hGSTA1-1**

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ Γ. ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Μ. Καρούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής, ΓΠΑ.**

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Μ. Καρούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής Γ.Π.Α.,
Εισηγητής

Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής Γ.Π.Α., Μέλος

Ν. Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γεωπονική Βιοτεχνολογία, Εργ. Ενζυμικής
Τεχνολογίας Γ.Π.Α, Μέλος

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Μ. Καρπούζα, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ν. Λάμπρου και τον επίκουρο καθηγητή κ. Κ. Μπεθάνη για την επίβλεψη και την πολύτιμη βοήθεια στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλα τα παλιά και νεότερα μέλη του εργαστηρίου της Φυσικής και της Ενζυμικής τεχνολογίας για την συμπαράσταση, βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω γενικά όλα τα παλιά και νεότερα μέλη του εργαστηρίου της Φυσικής και της Ενζυμικής τεχνολογίας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. Περίληψη.....	8
II. Abstract.....	10
Κεφάλαιο 1	12
Εισαγωγή.....	13
A. Κυκλοδεξτρίνες.....	13
1. Ιστορική αναδρομή.....	13
1.1. Ερευνητική περίοδος: 1936-1970	13
1.2. Η περίοδος εκμετάλλευσης: 1970-σήμερα.....	15
2. Παραγωγή των κυκλοδεξτρινών.....	16
3. Δομή	18
4. Κατηγορίες κυκλοδεξτρινών.....	19
4.1. Φυσικές κυκλοδεξτρίνες (Natural cyclodextrins)	19
4.2. Τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (Modified cyclodextrins).....	20
4.3. Μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες.....	23
4.4. Υδροξυαλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες.....	24
4.5. Ιοντικές κυκλοδεξτρίνες.....	24
5. Σχηματισμός συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με βιοδραστικές ενώσεις	25
5.1. Σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων ένωσης.....	26
5.2 Μηχανισμός συμπλοκοποίησης.....	27
6. Εφαρμογές των κυκλοδεξτρινών στη χορήγηση βιοδραστικών ενώσεων	28
B. Τρανσφεράση/μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST enzyme).....	33
1. Γλουταθειόνη (GSH)	33
2. Μεταφορές της γλουταθειόνης (GSTs)	35
2.1 Δομή των GSTs	36
2.2 Ταξινόμηση των GSTs.....	37
2.3 Τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1	39
2.4 Ρόλοι και καταλυτικές λειτουργίες των GSTs.....	41
2.5 Υποστρώματα των GSTs.....	42
3. Ενζυμική σταθερότητα	43
3.1 Το πρόβλημα της σταθερότητας των ενζύμων και οι παράγοντες που συμβάλλουν στην αδρανοποίησή τους.	43
3.2 Μέθοδοι βελτίωσης της ενζυμικής σταθερότητας.	45

Κεφάλαιο 2	47
Πειραματικό μέρος.....	48
Υλικά και μέθοδοι.....	48
1. Εξοπλισμός.....	48
2. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα.....	48
2.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων και σχετικά αντιδραστήρια.....	48
2.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	49
2.3 Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	50
3. Μέθοδοι	51
3.1 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης σε κύτταρα <i>E.coli</i> . 51	
3.2 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.	52
3.3 Διαπίδυση	52
3.4 Σύνθεση προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH- Sepharose-CL6B.	53
3.5 Καθαρισμός του ενζύμου hGSTA1-1 μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH- Sepharose-CL6B.	54
3.6 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS). 54	
3.6.1 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.....	55
3.7 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250.	56
4. Φωτομετρικός προσδιορισμός της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST).....	56
4.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο CDNB και GSH.....	56
5. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά Bradford (1976)....	57
6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	58
Κεφάλαιο 3	59
Αποτελέσματα	60
1. Καθαρισμός του ενζύμου hGSTA1-1	60
2. Επίδραση κυκλοδεξτρίνης και ενζυμικός προσδιορισμός της hGSTA1-1 παρουσία β- CD 63	
3. Κινητική ανάλυση του ενζύμου hGSTA1-1	65

4. Επίδραση pH στην ταχύτητα της αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1	71
5. Σύγκριση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου hGSTA1-1.....	73
6. Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m) του ενζύμου hGSTA1-1	75
7. Επίδραση της β -CD σε συνθήκες λυοφιλίωσης του hGSTA1-1	77
8. Θερμοδυναμική μελέτη του ενζύμου hGSTA1-1.....	80
9. Επίδραση της α - γυμοθρυψίνης στο ένζυμο hGSTA1-1.....	85
10. Επίδραση της θρυψίνης στο ένζυμο hGSTA1-1.....	88
10. Επίδραση ουρίας στην ενζυμική δραστηριότητα.....	90
Συζήτηση.....	93
Βιβλιογραφία	98

I. Περίληψη

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολικοσακχαρίτες και αποτελούνται από μόρια α-D-γλυκοπυρανόζης. Στην υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορούν να δεσμευθούν βιοδραστικές ενώσεις σχηματίζοντας σύμπλοκα έγκλεισης. Μέσω της συμπλοκοποίησης επιτυγχάνεται αύξηση της διαλυτότητας, βελτίωση της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών ενώσεων καθώς και η μείωση των παρενεργειών τους.

Το ένζυμο hGSTA1-1 ανήκει στην οικογένεια των μεταφορασών της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs) τα οποία είναι πολυλειτουργικά ένζυμα του κυττάρου που συμμετέχουν σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης αδρανοποιώντας εξωγενείς ή ενδογενείς τοξικούς παράγοντες, δημιουργώντας λιγότερο βλαβερές μορφές τους. Λόγω του σημαντικού αποτοξινωτικού ρόλου τους, αποτελούν μια από τις πιο μελετημένες τάξεις των ενζύμων. Σε επίπεδο εφαρμογών, τα ένζυμα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Ένα από τα προβλήματα που θα πρέπει όμως να αντιμετωπιστεί είναι η αστάθεια που εμφανίζουν τόσο σε λειτουργικό όσο κι σε αποθηκευτικό επίπεδο.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας β-κυκλοδεξτρίνης στην δραστικότητα και σταθερότητα του ενζύμου hGSTA1-1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Με το καθαρό ένζυμο έγινε κινητική μελέτη της καταλυτικής αντίδρασης ως προς τα υποστρώματα GSH και CDNB παρουσία και απουσία β-κυκλοδεξτρίνης. Στη συνέχεια έγινε μια σειρά πειραμάτων με στόχο τη μελέτη των μεταβολών που παρατηρούνται στα θερμοδυναμικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν το σύμπλοκο hGSTA1-1 και β-CD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της β-CD επιδρά θετικά στην ενζυμική δραστικότητα και στην πορεία της ενζυμικής αντίδρασης κάτω από συνθήκες στρες του ενζύμου, όπως η υψηλή και η χαμηλή θερμοκρασία και τα ακραία pH, αλλά δεν επιδρά θετικά κατά την λυοφιλίωση του ενζύμου. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της β-CD στη σταθερότητα του ενζύμου παρουσία ενώσεων που προκαλούν αποικοδόμηση όπως η χυμοθριψίνη και η θρυψίνη, και ενώσεις που προκαλούν μετουσίωση όπως η ουρία. Τα πειράματα

έδειξαν ότι το υπό μελέτη ένζυμο σταθεροποιείται σε μεγάλο βαθμό διότι εμποδίζεται η αντίδραση και η αλληλεπίδραση με άλλα μόρια, όπως η χυμοθριψίνη, και η ουρία. Αντίθετα, στην περίπτωση της θρυψίνης, η παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα του ενζύμου λόγω της αύξησης της δραστηριότητας του ενζύμου της θρυψίνης.

Συμπερασματικά οι μετρήσεις που έγιναν, έδωσαν πληροφορίες για την επίδραση της β-κυκλοδεξτρίνης στην δραστηριότητα και δομική σταθερότητα του ενζύμου και έδειξαν ότι, παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης, σε κάποιες περιπτώσεις επιτυγχάνεται η βελτίωση της σταθερότητας και δραστηριότητας του ενζύμου.

II. Abstract

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharide compounds consisting of α -D-glucopyranose units. Cyclodextrins are able to form host-guest complexes because their hydrophobic cavity provides a microenvironment able to bind hydrophobic molecules. Through complexing, increase of solubility, improvement of stability and reduction of side effects of the guest bioactive compounds are achieved.

The enzyme hGSTA1-1 belongs to the family of glutathione S-transferases (GSTs). GSTs are crucial enzymes in the cell detoxification process catalyzing the nucleophilic attack of glutathione (GSH) on toxic electrophilic substrates and producing a compound of lower toxicity. Given their significant detoxification role, they constitute one of the most well studied classes of enzymes. In terms of applications, these enzymes are an important tool in both the research and industrial settings. A problem that has yet to be addressed is the instability exhibited at both operational and a storage level.

This work investigated the effect of β -cyclodextrin in the activity and stability of the enzyme hGSTA1-1. Initially, we performed heterologous expression and purification of the enzyme by affinity chromatography. Using the purified enzyme, we studied the kinetics of the catalytic reaction of the substrates GSH and CDNB, in the presence and absence of β -cyclodextrin. Furthermore, a series of experiments were performed in order to determine the changes in thermodynamic variables which characterize the complex of hGSTA1-1 and β -CD. The results revealed that the presence of β -CD has a positive effect on the enzymatic activity of the enzyme under conditions of stress, such as high or low temperatures and extreme pH, but has no positive effect in enzyme lyophilization. Finally, the effects of β -CD on enzyme stability were studied in the presence of enzymes that cause degradation as chymotrypsin and trypsin, and compounds that cause denaturation such as urea. The results showed that β -cyclodextrin exhibits a positive effect on enzyme stability because it reduces the interactions with and the effects of chymotrypsin and urea. On the other hand, in the case of trypsin, β -cyclodextrin has a negative effect on enzyme stability due to an apparent boost in the activity of trypsin.

In conclusion, this study investigated the effect of β -cyclodextrin in the activity and stability of this enzyme and has shown that presence of β -cyclodextrin has a positive effect on enzyme activity and stability under certain conditions.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

A. Κυκλοδεξτρίνες

1. Ιστορική αναδρομή

Το πρώτο έγγραφο που έκανε αναφορά για το σχηματισμό άγνωστων μικρών κρυσταλλικών ουσιών στη ζύμωση του αμύλου εκδόθηκε το 1891 (Villiers, 1891). Ο Γάλλος συγγραφέας Villiers θεώρησε ότι αυτή η κρυσταλλική ουσία αποτελεί ένα είδος κυτταρίνης και την ονόμασε "Cellulosine". Περίπου 15 χρόνια αργότερα ο Franz Schardinger, ένας Αυστριακός μικροβιολόγος μελετώντας μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων κατάφερε να απομονώσει το μικροοργανισμό *Bacillus macerans* (Schardinger, 1903). Αυτός είχε τη δυνατότητα να παράγει δύο διακριτές κρυσταλλικές ουσίες σε καλλιέργειες που περιείχαν άμυλο. Επειδή αυτές οι ουσίες είχαν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των ήδη γνωστών δεξτρινών, οι ουσίες αυτές ονομάστηκαν α- και β- δεξτρίνες (Andersen et al., 1963, Schardinger et al., 1911). Η χημική δομή αυτών των ουσιών ήταν ακόμη άγνωστη. Έπρεπε να περάσουν 45 χρόνια (1891-1936) μέχρι ο Freudenberg και η ερευνητική του ομάδα να προσδιορίσουν την κυκλική δομή των α- και β- δεξτρινών. Η περίοδος αυτή των 45 χρόνων ονομάστηκε "Περίοδος ανακάλυψης" των κυκλοδεξτρινών.

1.1. Ερευνητική περίοδος: 1936-1970

Στις αρχές του 1930 ο Freudenberg και η ερευνητική του ομάδα βασιζόμενοι στις δικές τους παρατηρήσεις καθώς και στα πειραματικά αποτελέσματα των Karle και Miekeley κατέληξαν στο ότι οι δεξτρίνες αποτελούνται από μονάδες μαλτόζης με α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς μόνο, αποδίδοντας έτσι την κυκλική δομή των κρυσταλλικών δεξτρινών (Freudenberg et al., 1953). Την περίοδο 1948-1950

ανακαλύφθηκε η γ-κυκλοδεξτρίνη και προσδιορίστηκε η δομή της (Freudenberg and Cramer, 1948).

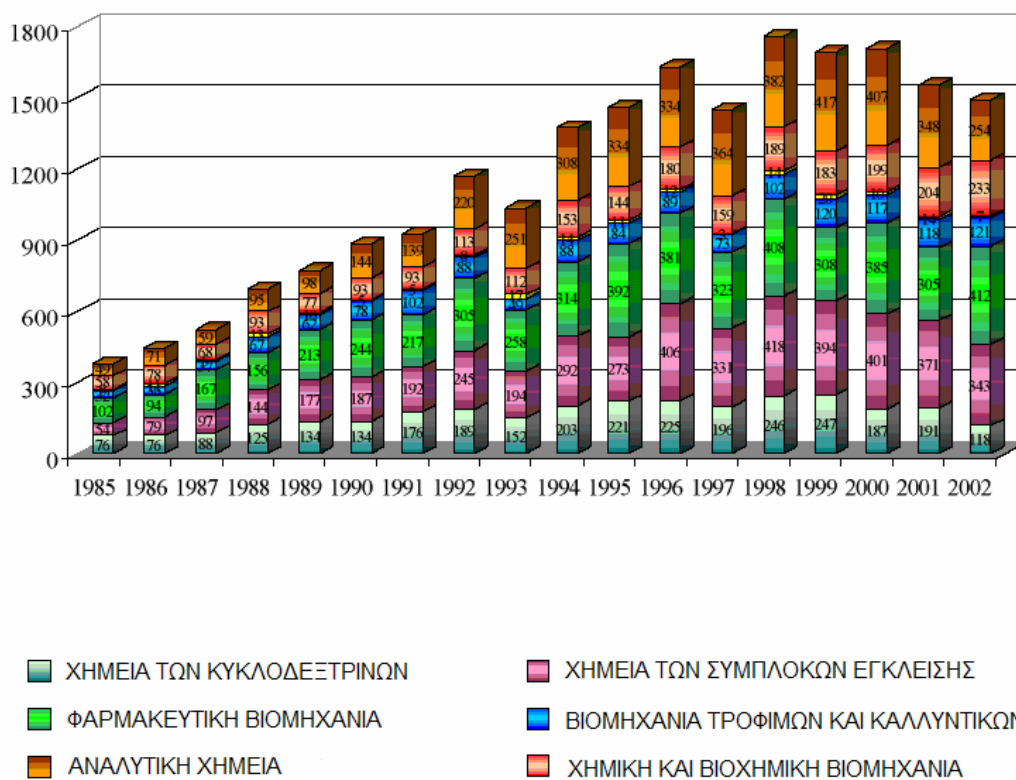
Στις αρχές της δεκαετίας του 50 οι ομάδες των French και Cramer ερεύνησαν εντατικά την ενζυμική παραγωγή κυκλοδεξτρινών, την απομόνωση των καθαρών συστατικών και τον προσδιορισμό των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων τους. Η ομάδα του French ανακάλυψε ότι υπάρχουν ακόμα μεγαλύτερες κυκλοδεξτρίνες, ενώ η ομάδα του Cramer ασχολήθηκε με τη συμπλοκοποίηση των κυκλοδεξτρινών (French, 1957, Cramer, 1954). Ο Freudenberg, Cramer, και Plieninger απέκτησαν δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (patent) το 1953 (Freudenberg et al., 1953). Η πατέντα αυτή περιέγραφε ουσιαστικά τις πιο σημαντικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών. Το 1953 εκδόθηκε από τον French το πρώτο ουσιαστικό άρθρο για τις κυκλοδεξτρίνες (French, 1957). Ακολούθησαν οι μονογραφίες των Thoma και Stewart το 1965 (Thoma et al., 1965) και του Caesar το 1968 (Caesar, 1986, Charoenlap et al., 2004). Όμως μια λανθασμένη δημοσίευση του French σχετικά με την τοξικότητα των κυκλοδεξτρινών στον ανθρώπινο οργανισμό αποθάρρυνε πολλούς επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν κυκλοδεξτρίνη σε προϊόντα που προορίζονταν για ανθρώπινη χρήση. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του '60 είχε διευκρινιστεί τόσο η παρασκευή των κυκλοδεξτρινών στο εργαστήριο, όσο και οι φυσικές και χημικές ιδιότητες αυτών αλλά και οι ιδιότητες των σχηματιζόμενων συμπλόκων τους.

Τα συμπεράσματα που αποσαφηνίζονται με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία εκείνης της εποχής ήταν:

- Οι κυκλοδεξτρίνες είναι πολύ ενδιαφέρουσες ουσίες. Αξίζουν περαιτέρω μελέτη, ιδιαίτερα λόγω των φαινομενικά βιομηχανικών δυνατοτήτων τους.
- Οι κυκλοδεξτρίνες είναι πολύ ακριβά μόρια και είναι διαθέσιμα μόνο σε μικρές ποσότητες.
- Οι κυκλοδεξτρίνες είναι εξαιρετικά τοξικές ουσίες, ως εκ τούτου η χρησιμοποίησή τους για ανθρώπινη κατανάλωση φαίνεται να είναι αμφισβητήσιμη.

1.2. Η περίοδος εκμετάλλευσης: 1970-σήμερα

Στα χρόνια που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν τοξικολογικές μελέτες και έρευνες που απέδειξαν την ασφάλεια των κυκλοδεξτρινών για θεραπευτική χρήση στον άνθρωπο. Αυτό οδήγησε σε θεαματική αύξηση των δημοσιεύσεων σχετικά με τις κυκλοδεξτρίνες, με τον αριθμό τους να φτάνει και να ξεπερνάει τις 26.000 το 2003 (Εικόνα 1) (Cyclodextrin News, 1986).



Εικόνα 1: Οι δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τις κυκλοδεξτρίνες σε διάφορα ερευνητικά πεδία ανά χρόνο (1985-2002) (Szejtli, 2004).

Αυτό που αξίζει να αναφερθεί είναι η σχέση της τιμής της β-CD και της παραγόμενης ποσότητας ανά χρόνο από το 1970 έως σήμερα. Το 1973 1Kg β-CD κόστιζε 2000\$ ενώ σήμερα κοστίζει μερικά μόνο δολάρια.

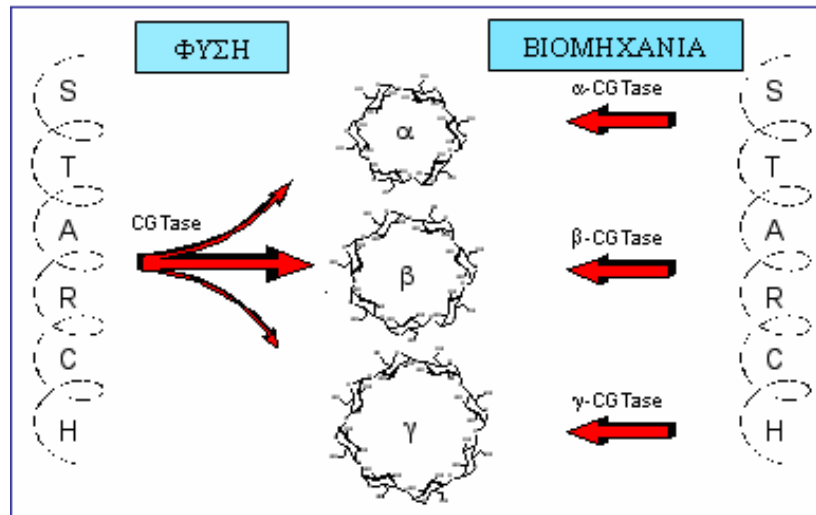
Το 1^ο διεθνές συνέδριο κυκλοδεξτρινών πραγματοποιήθηκε το 1981 (Szejtli, 1981). Από τότε μέχρι σήμερα επαναλαμβάνεται κάθε δύο χρόνια (Coleman et al., 1990, Loftsson et al., 2002, Yenpetch et al., 2011). Το τελευταίο συνέδριο (16^ο) πραγματοποιήθηκε στην Κίνα το Μάιο του 2012 (Li et al., 2012).

2. Παραγωγή των κυκλοδεξτρινών

Η παραγωγή των κυκλοδεξτρινών είναι μια σχετικά απλή διεργασία. Περιλαμβάνει την κατεργασία του αμύλου από μια σειρά ενζύμων, βασικότερο των οποίων είναι η γλυκοσυλο-τρανσφεράση των κυκλοδεξτρινών (CGTase) (Yusoff et al., 2002, Liu et al., 2012). Το συγκεκριμένο ένζυμο παράγεται από μικροοργανισμούς όπως ο *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytaca*, και *Bacillus circulans*. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται γενετικά τροποποιημένα ένζυμα για βιομηχανική παραγωγή κυκλοδεξτρινών (Rosso et al., 2005, Duan et al., 2012).

Η διαδικασία παραγωγής κυκλοδεξτρινών περιλαμβάνει τα εξής βασικά βήματα (Εικόνα 2):

- Ρευστοποίηση του αμύλου με θέρμανση ή με προσθήκη της α- αμυλάσης.
- Προσθήκη της CGTάσης με δυνατότητα σύνθεσης όλων των τύπων των φυσικών κυκλοδεξτρινών.
- Προκύπτει ένα μείγμα α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης σε αναλογία με το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Κάθε CGTάση έχει τη δική της χαρακτηριστική αναλογία με το εκάστοτε ένζυμο.
- Ο διαχωρισμός του παραπάνω μείγματος βασίζεται στη διαφορετική υδατοδιαλυτότητα των μορίων.



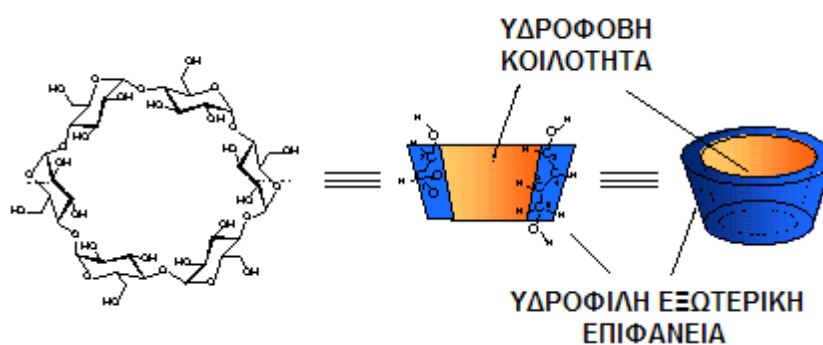
Εικόνα 2: Εκλεκτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για τη βιομηχανική παραγωγή των α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών (Biwer et al., 2002).

Η β- κυκλοδεξτρίνη έχει πολύ μικρή υδατοδιαλυτότητα (18,5 g/L) και μπορεί να ανακτηθεί εύκολα με κρυστάλλωση. Η α- κυκλοδεξτρίνη και η γ- έχουν μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα (145 και 232g/L αντίστοιχα). Ο διαχωρισμός τους βασίζεται σε χρωματογραφικές τεχνικές (Rosso et al., 2005).

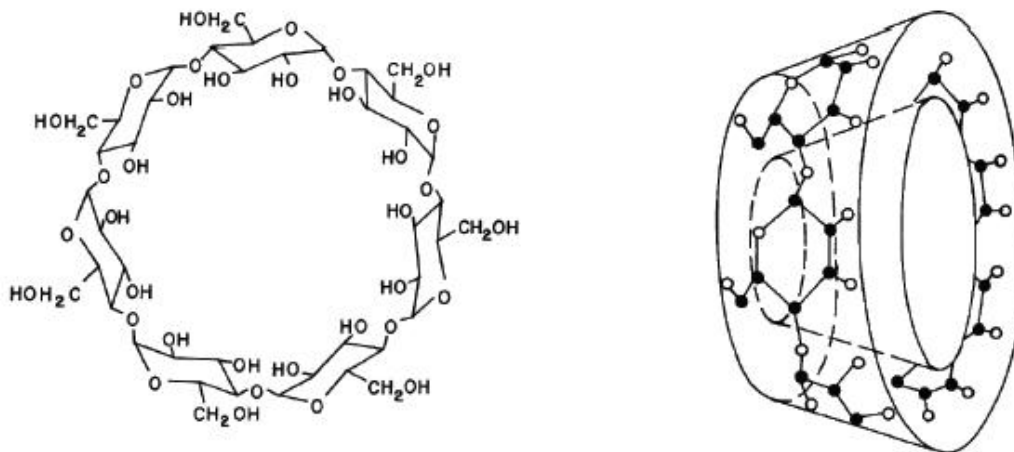
Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής μετατροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας παράγοντας συμπλοκοποίησης. Ο σκοπός της προσθήκης αποτελεί η συμπλοκοποίηση της επιθυμητής κυκλοδεξτρίνης και η καθίζηση αυτού του συμπλόκου. Ο σχηματισμός του συμπλόκου κατευθύνει τη μετατροπή του αμύλου στη σύνθεση της επιθυμητής κυκλοδεξτρίνης και την αύξηση της περιεκτικότητας αυτής στο τελικό μείγμα (Szejtli, 1998, Urban et al., 2012). Στο τελικό στάδιο η κυκλοδεξτρίνη ανακτάται με φυγοκέντρηση και διαχωρίζεται από τον παράγοντα συμπλοκοποίησης. Οι κυριότεροι παράγοντες συμπλοκοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι το τολουένιο, η κυκλοεξαδεκανόλη και η δεκανόλη. Η προσθήκη τολουενίου κατευθύνει τη μετατροπή του αμύλου προς το σχηματισμό β-CD ενώ η προσθήκη της 1- δεκανόλης και της κυκλοεξαδεκανόλη κατευθύνει προς το σχηματισμό α- CD και γ- CD αντίστοιχα. Η τελική καθαρότητα των προϊόντων είναι της τάξης των 99% (Biwer et all., 2002).

3. Δομή

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες και αποτελούνται από μόρια α-D-γλυκοπυρανόζης. Τα μόρια αυτά συνδέονται με α-1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το σχήμα τους δεν είναι κυλινδρικό αλλά προσομοιάζει το σχήμα κόλουρου κώνου (Εικόνα 3). Αυτό οφείλεται στην έλλειψη ελεύθερης περιστροφής των δεσμών που συνδέουν τις μονάδες γλυκοπυρανόζης. Κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης αποτελείται από 3 υδροξυλομάδες. Δύο από αυτές είναι δευτερεύουσες και εντοπίζονται στον άνθρακα C-2 και C-3 και μία είναι πρωτεύουσα στον άνθρακα C-6. Οι υδροξυλομάδες προσδίδουν στην εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών υδρόφιλες ιδιότητες και είναι υπεύθυνες για τη διαλυτότητά τους στο νερό. Οι πρωτεύουσες υδροξυλομάδες εντοπίζονται στο στενό άκρο του κώνου, ενώ οι δευτερεύουσες εντοπίζονται στο ευρύτερο άκρο. Το εσωτερικό των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβο, λόγω της παρουσίας των αιθερικών οξυγόνων στο O-4 και των υδρογόνων που είναι προσαρτημένα στους άνθρακες C-3 και C-5. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μια κοιλότητας για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων μορίων (Εικόνα 4) (Saenger et al., 1998, Loftsson et al., 2005a, Loftsson et al., 2005b, Nguyen et al., 2012).



Εικόνα 3: Η διαμόρφωση των μονάδων γλυκοπυρανόζης έχει σαν αποτέλεσμα η εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών να είναι υδρόφιλη και η εσωτερική υδρόφοβη (Del Valle, 2004).

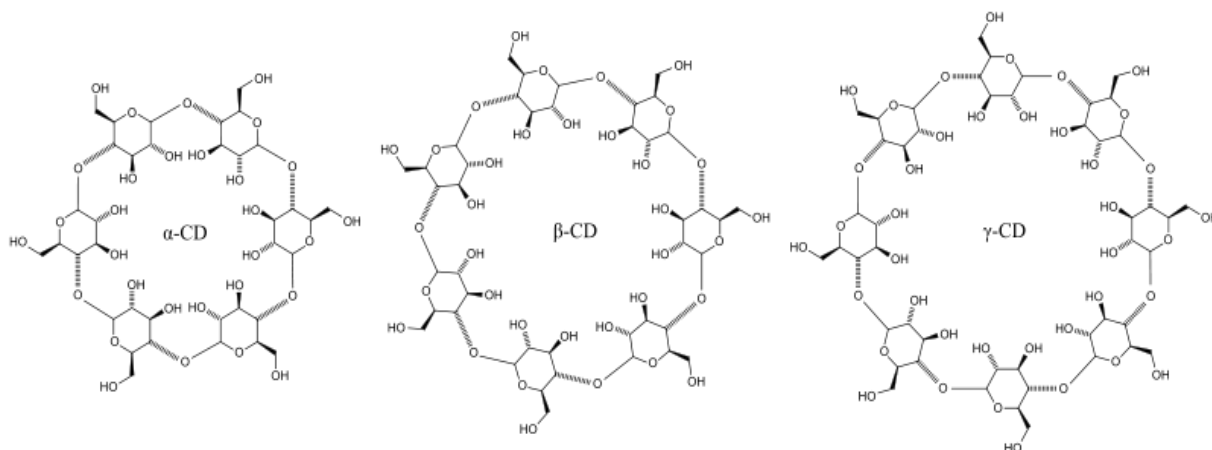


Εικόνα 4: Η χημική δομή και η δομή του κόλουρου κώνου της α-κυκλοδεξτρίνης.

4. Κατηγορίες κυκλοδεξτρινών

4.1. Φυσικές κυκλοδεξτρίνες (Natural cyclodextrins)

Οι πιο γνωστές φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι οι α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνη (**Εικόνα 5**). Η α-κυκλοδεξτρίνη αποτελείται από 6 μόρια γλυκοπυρανόζης, η β-κυκλοδεξτρίνη από 7 και η γ-κυκλοδεξτρίνη από 8. Έχουν επίσης παρασκευασθεί κυκλοδεξτρίνες με 9, 10, 11, 12 και 13 μονάδες γλυκοπυρανόζης που ονομάζονται δ, ε, ζ, η, θ κυκλοδεξτρίνες, αντίστοιχα (Ondo et al., 2011). Κυκλοδεξτρίνες με λιγότερες από 6 μονάδες γλυκοπυρανόζης δεν μπορεί να υπάρξουν λόγω των παραπάνω στεreoχημικών περιορισμών (Szejtli, 1996, Larsen, 2002).



Εικόνα 5: Η δομή των φυσικών κυκλοδεξτρινών α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνη

4.2. Τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (Modified cyclodextrins)

Οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που έχουν παραχθεί και μελετηθεί είναι πολλές. Η παραγωγή τους βασίζεται στην αντίδραση χημικών μορίων με τις υδροξυλομάδες των κυκλοδεξτρινών (George et al., 2012). Οι υδροξυλομάδες στον C-6 έχουν τη μεγαλύτερη ικανότητα αντίδρασης, ενώ οι υδροξυλομάδες στον C-3 έχουν τη μικρότερη. Με τη μεταβολή των συνθηκών της αντίδρασης, όπως το pH, τη θερμοκρασία και τα αντιδραστήρια, η αντίδραση μπορεί να κατευθυνθεί προς συγκεκριμένη πορεία και να επιτευχθεί έτσι η εκλεκτική υποκατάσταση μίας συγκεκριμένης ομάδας (Wyrwalski et al., 2011). Κάθε μονάδα γλυκοκυρανόζης έχει 3 ελεύθερες υδροξυλομάδες, άρα η α-κυκλοδεξτρίνη έχει 18 ελεύθερες υδροξυλομάδες που μπορούν να υποκατασταθούν, η β-κυκλοδεξτρίνη έχει 21 και η γ-κυκλοδεξτρίνη έχει 24. Έτσι, με την υποκατάσταση του ατόμου υδρογόνου ή της υδροξυλομάδας από διάφορες ομάδες όπως άλκυλο-, υδροξυάλκυλο, καρβοξυλοάλκυλο-, αμινο-, θείο- γλυκόσυλο-, αλλά και άλλες ομάδες, μπορούν να παραχθούν μια σειρά από παράγωγα με χημικές αντιδράσεις (Deng et al., 2007, Wyrwalski et al., 2011).

Κατά την παραγωγή των τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών δημιουργούνται διάφορα παράγωγα και ισομερή. Γι αυτό το λόγο η ονοματολογία πρέπει να είναι σαφής και να περιλαμβάνει τουλάχιστον την πρόδρομη κυκλοδεξτρίνη, τον τύπο και τον αριθμό των υποκαταστατών.

Οι υποκαταστάτες συνήθως δηλώνονται πριν την αρχική κυκλοδεξτρίνη με μία συντόμευση. Στη συντόμευση αυτή μπορεί να φανεί και η ακριβής θέση του υποκαταστάτη. Για παράδειγμα η υδροξυλομάδα του υδροξυπροπυλο- υποκαταστάτη μπορεί να βρίσκεται σε έναν από τους τρεις άνθρακες της προπυλικής αλυσίδας. Αν έχει ενωθεί με τον C-2, το παράγωγο θα συμβολίζεται ως 2HP-β-CD.

Όταν θέλουμε να συμβολίσουμε τον αριθμό των υποκαταστατών που συνδέονται με την πρόδρομη κυκλοδεξτρίνη, ο αριθμός ακολουθεί τον υποκαταστάτη. Έτσι η HP4-β-CD υποδηλώνει μία β-κυκλοδεξτρίνη με 4 υδροξυπρόπυλο- ομάδες. Ο αριθμός αυτός ονομάζεται μοριακός βαθμός υποκατάστασης (molar degree of substitution, MS) και εκφράζει το μέσο αριθμό αλκυλομάδων στο δακτύλιο της κυκλοδεξτρίνης.

Οι βασικές τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιούνται ως έκδοχα στις φαρμακομορφές είναι όλες παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης (Rasheed and Kumar, 2008):

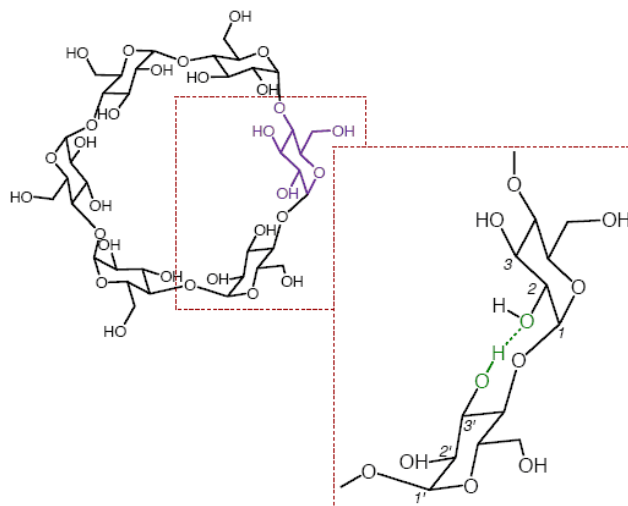
- Τυχαία μεθυλιωμένα παράγωγα (M14-β-CD).
- Δύο διαφορετικά υδροξυπρόπυλο- παράγωγα [(2HP)3-β-CD), (2HP)7-β-CD)].
- Σουλφο-βούτυλο αιθερικά παράγωγα (SBE7-β-CD).
- Γλυκόσυλο- και μαλτόσυλο- κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες περιέχουν μόνο μόρια γλυκόζης (G_1 -β-CD) ή μαλτοσακχαρίτες όπως η μαλτόζη (G_2 -β-CD) συνδεδεμένα απευθείας με α-(1-6) γλυκοζιτικό δεσμό στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης.

Η παραγωγή τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών έχει σαν στόχο (Oguma and Kawamoto, 2003):

- Την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων τους. Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό. Η β-κυκλοδεξτρίνη έχει τη μικρότερη υδατοδιαλυτότητα λόγω της περισσότερο άκαμπτης δομής που διαθέτει (Loftsson and Duchene, 2007). Αυτό οφείλεται

στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της υδροξυλομάδας του C-2 της μιας μονάδας και της υδροξυλομάδας του C-3 της γειτονικής ομάδας γλυκοπυρανόζης. Έτσι σχηματίζονται επτά ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της κυκλοδεξτρίνης με τα μόρια του νερού (ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου) (**Εικόνα 6**). Αυτή η «ζώνη δεσμών υδρογόνου» δεν είναι πλήρης στις υπόλοιπες φυσικές κυκλοδεξτρίνες και γι'αυτό ευνοείται η αλληλεπίδραση αυτών με τα μόρια του νερού (Rao, and Stella, 2003).

- Τη βελτίωση της αλληλεπίδρασης των εγκλωβιζόμενων μορίων με τις κυκλοδεξτρίνες. Η προσθήκη των ομάδων γλυκοπυρανόζης προκαλεί αύξηση της χωρητικότητας της υδρόφοβης κοιλότητας με αποτέλεσμα ένα μεγαλύτερο μέρος του μορίου να εισέρχεται σε αυτή και να αλληλεπιδρά αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τη συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης.
- Την έκλυση συγκεκριμένης καταλυτικής ομάδας στη θέση σύνδεσης.
- Το σχηματισμό αδιάλυτων δομών που περιέχουν κυκλοδεξτρίνες, όπως τα πολυμερή, με στόχο την εφαρμογή τους στη χρωματογραφία (Szejtli, 2004).



Εικόνα 6: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της υδροξυλομάδας του C-2 της μιας μονάδας γλυκοπυρανόζης και της υδροξυλομάδας του C-3 της γειτονικής ομάδας γλυκοπυρανόζης στο μόριο της β-κυκλοδεξτρίνης.

Για την εκλεκτική υποκατάσταση των κυκλοδεξτρινών υπάρχουν τρεις βασικοί μέθοδοι (Khan et al., 1998):

- **Σύντομοι:** Αξιοποιείται η χημεία των κυκλοδεξτρινών ώστε να παραχθεί το επιθυμητό παράγωγο με τον πιο σύντομο τρόπο.
- **Μακροσκελείς:** Λαμβάνουν χώρα μία σειρά από βήματα προστασίας και αποπροστασίας των κυκλοδεξτρινών με σκοπό τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών της αντίδρασης.
- Η μέθοδος της **βαριάς:** οι κυκλοδεξτρίνες αντιδρούν χωρίς καμία εκλεκτικότητα και δίνουν ένα μίγμα προϊόντων. Στη συνέχεια απομονώνεται το επιθυμητό παράγωγο από τα ισομερή του με χρωματογραφικές τεχνικές.

4.3. Μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες

Με την προσθήκη του μέθυλο-υποκαταστάτη στις υδροξυλομάδες των κυκλοδεξτρινών προκαλείται σημαντική αύξηση στην υδατοδιαλυτότητα της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης. Η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας εξαρτάται από την αύξηση του αριθμού των υποκαταστατών, έως ότου τα 2/3 των υδροξυλομάδων να υποκατασταθούν. Η υδατοδιαλυτότητα όμως μειώνεται με περαιτέρω αύξηση των υποκαταστατών. Οι κυκλοδεξτρίνες που περιέχουν 14 μεθόξυ-ομάδες έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή διαλυτότητα, ενώ οι κυκλοδεξτρίνες με 21 μεθόξυ-ομάδες παρουσιάζουν τη μικρότερη δυνατή διαλυτότητα, η οποία όμως είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της μη μεθυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης (Szejtli, 1992, Szente 1999).

Οι πιο γνωστές εμπορικά μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες είναι οι : DM14-β-CD [επτάκις (2,6-δι-ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεκτρίνη] (DIMEB) και η 2,3,6-TM21-β-CD [επτάκις (2,3,6-τρι-ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη] (TRIMEB), των οποίων η διαλυτότητα στο νερό είναι 57g/100mL και 31g/100mL αντίστοιχα, σε σχέση με το 1,8g/100mL που είναι η υδατοδιαλυτότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μίγμα τυχαία μεθυλιωμένων β-κυκλοδεξτρινών.

Η μεθυλίωση όμως αυξάνει και την ικανότητα συμπλοκοποίησης των κυκλοδεξτρινών καθώς η υποκατάσταση των υδροξυλομάδων στις θέσεις C-2 και C-6 αυξάνει την υδροφοβικότητα της εσωτερικής κοιλότητας. Η σταθερά συμπλοκοποίησης της 2,6-DM14-β-CD με πολλές βιοδραστικές ενώσεις είναι κατά μέσο όρο 5 φορές μεγαλύτερη από αυτή της β-CD. Παρόλα αυτά, η μεθυλίωση των υδροξυλομάδων στη θέση C-3 μειώνει σημαντικά την ικανότητα συμπλοκοποίησης της κυκλοδεξτρίνης (Szejtli, 1992).

4.4. Υδροξυαλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες

Παράγονται μετά από την κατεργασία των κυκλοδεξτρινών με οξείδια των αλκυλενίων και την υποκατάσταση των ελεύθερων υδροξυλομάδων στις θέσεις C-2, C-3 και C-6 κάθε μονάδας γλυκοπυρανόζης. Το πιο γνωστό παράγωγο είναι η (2HP)-β-CD η οποία παρασκευάζεται μετά από κατεργασία της β-CD με οξείδιο του προπυλενίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται στις πρωτεύουσες και στις δευτερεύουσες υδροξυλομάδες. Έτσι παράγεται ένα μίγμα από ισομορφές της (2HP)-β-CD οδηγώντας σε ένα προϊόν άμορφο, μη κρυσταλλικό και με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (27 φορές πιο υδατοδιαλυτό από τη β-CD). Η ικανότητά της να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με πάρα πολλές βιοδραστικές ενώσεις και η ασφάλεια της τόσο για παρεντερική όσο και για per os χορήγηση, οδήγησε σε ευρεία χρησιμοποίηση της HP-β-CD σε φαρμακομορφές τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (Szejtli, 1992, Szente 1999, Szejtli, 2004).

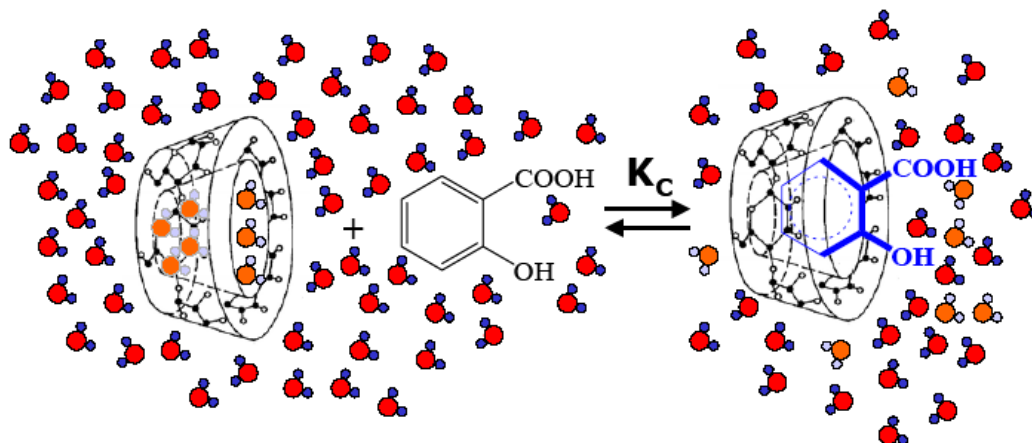
4.5. Ιοντικές κυκλοδεξτρίνες

Παράγονται μετά από την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων των κυκλοδεξτρινών με υποκαταστάτες που ιονίζονται εύκολα. Η ικανότητα για συμπλοκοποίηση των ιοντικών κυκλοδεξτρινών επηρεάζεται από το pH του διαλύματος, το βαθμό υποκατάστασης και τις ιονίζουσες ομάδες.

Οι ιοντικές κυκλοδεξτρίνες διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες: τις ανιονικές και τις κατιονικές. Τα κυριότερα παράγωγα των ανιονικών κυκλοδεξτρινών είναι τα σουλφαλκυλαιθερο- παράγωγα. Η σουλφοπροπυλοαιθυλο-β-CD (SPE-β-CD) και η σουλφοβουτυλο-αιθυλο-β-CD (SBE-β-CD) παράγονται μετά από την αντίδραση της β-CD σε αλκαλικό υδατικό διάλυμα με propane-sultone και butane-sultone αντίστοιχα. Τα ευρύτερα παραγόμενα παράγωγα της SBE-β-CD είναι άμορφα και έχουν μεγάλη υδατοδιαλυτότητα (>50mg/mL). Η SBE7-β-CD χρησιμοποιείται σε κλινικά πειράματα για παρεντερική χορήγηση φαρμάκων (Szejtli 1992, Okimoto et al., 1996, Stella and Rajewski, 1997, Hirayama et al., 1999, Szente et al., 1999)

5. Σχηματισμός συμπλόκων κυκλοδεξτρινών με βιοδραστικές ενώσεις

Οι κυκλοδεξτρίνες διακρίνονται για την ικανότητα τους να εγκλωβίζουν στην υδρόφοβη κοιλότητά τους είτε ολόκληρα μόρια υδρόφοβων βιοδραστικών ενώσεων είτε υδρόφοβα τμήματα των ενώσεων αυτών όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα. **(Εικόνα 7)** (Masson and Loftsson, 2002, Uekama, 2004, Kaminski et al., 2012). Όταν μια κυκλοδεξτρίνη βρεθεί σε ένα υδατικό διάλυμα, η ελαφρώς απολική κοιλότητά της καταλαμβάνεται από μόρια ύδατος που χαρακτηρίζονται ως αδρανή. Τα μόρια αυτά μπορούν να υποκατασταθούν άμεσα από κατάλληλα ξενιζόμενα μόρια που έχουν μικρότερη πολικότητα από το νερό.



Εικόνα 7: Ο σχηματισμός συμπλόκου έγκλεισης βιοδραστικής ένωσης με κυκλοδεξτρίνη (σύμπλοκο σαλικυλικού οξέος : β-κυκλοδεξτρίνης)

Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα ονομάζονται “σύμπλοκα έγκλεισης” διότι δε σχηματίζονται πραγματικοί χημικοί δεσμοί μεταξύ των μορίων (Kaminski et al., 2012). Η σταθερότητα των συμπλόκων αυτών οφείλεται σε:

- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
- Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- Δεσμούς υδρογόνου.
- Δυνάμεις Van der Waals.
- Στην απομάκρυνση μορίων νερού ‘πλούσιων σε ενθαλπία’ από την υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

5.1. Σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων ένωσης

Η σταθερά συμπλοκοποίησης ή σταθερά σχηματισμού συμπλόκου είναι μια σταθερά που προσδιορίζεται πειραματικά μετρώντας τη μεταβολή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας (π.χ. διαλυτότητα, απορρόφηση) του βιοδραστικού μορίου με αλλαγές της συγκέντρωσης τόσο του μορίου όσο και της κυκλοδεξτρίνης. Η τιμή της σταθεράς

αυτής, με μονάδα το M^{-1} , αποτελεί το μέτρο της ικανότητας συμπλοκοποίησης των διαφόρων κυκλοδεξτρινών.

Η στοιχειομετρική αναλογία των συμπλόκων που σχηματίζονται διαφέρει και εξαρτάται από τον τύπο της κυκλοδεξτρίνης, το μέγεθος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της βιοδραστικής ένωσης. Η απλούστερη και συχνότερα απαντούμενη στοιχειομετρική αναλογία είναι ίση με 1:1.

Όταν όμως η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης είναι αρκετά μεγάλη δύο μόρια φαρμάκου μπορούν να εγκλωβιστούν, οπότε σχηματίζεται σύμπλοκο με στοιχειομετρία 2:1 και αποτελεί μια σπανιότερη περίπτωση.

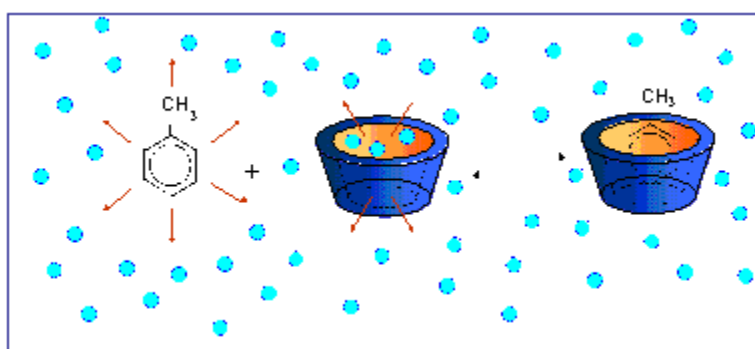
Αν το βιοδραστικό μόριο είναι πολύ μεγάλο και κατά προτίμηση γραμμικό (π.χ. itraconazole, linoleic acid) τότε απαιτούνται περισσότερα από ένα μόρια κυκλοδεξτρίνης για να το εγκλωβίσουν οπότε σχηματίζονται σύμπλοκα μεγαλύτερης τάξης ως προς την κυκλοδεξτρίνη (1:2 για το SL_2 , 1:3 για το SL_3) εκτός από το σύμπλοκο με στοιχειομετρία 1:1.

5.2 Μηχανισμός συμπλοκοποίησης

Ο εγκλωβισμός ενός τμήματος ή ολόκληρης της βιοδραστικής ουσίας στην υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης οφείλεται σε μία σειρά φαινομένων και αλληλεπιδράσεων. Ο σχηματισμός των συμπλόκων έγκλεισης των κυκλοδεξτρινών οφείλεται σε φαινόμενα όπως:

- ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
- αλληλεπιδράσεις Van der Waals
- υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- δεσμοί υδρογόνου
- απελευθέρωση μορίων ύδατος 'πλούσιων σε ενθαλπία'
- αλληλεπίδραση φόρτισης-μεταφοράς

Η συμπλοκοποίηση μορίων στις κυκλοδεξτρίνες είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πολλών ενδομοριακών δυνάμεων οι οποίες επηρεάζονται από τη φύση του εγκλωβιζόμενου μόριου, από την κυκλοδεξτρίνη και από το διαλύτη (**Εικόνα 8**). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι αυτό αφορά μόνο στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο μόριο της βιοδραστικής ουσίας και την επιφάνεια της υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης και όχι στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη βιοδραστική ουσία και τις ομάδες των υποκαταστατών στις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (Szejtli, 1995, Szejtli, 1996, Connors, 1996).



Εικόνα 8: Ο σχηματισμός των συμπλόκων έγκλεισης περιλαμβάνει πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιοδραστικού μορίου, διαλύτη και κυκλοδεξτρίνης (Del Valle, 2004).

6. Εφαρμογές των κυκλοδεξτρινών στη χορήγηση βιοδραστικών ενώσεων

- Αύξηση της διαλυτότητας βιοδραστικών ενώσεων

Η χρήση των κυκλοδεξτρινών έχει ως στόχο την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας διαφόρων βιοδραστικών μορίων με το σχηματισμό ενώσεων έγκλεισης. Η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των βιοδραστικών ουσιών εκφράζεται με το συντελεστή διαλυτοποίησης που ισούται με το λόγο της διαλυτότητας της βιοδραστικής ουσίας

παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης κυκλοδεξτρίνης προς τη διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας απουσία κυκλοδεξτρίνης.

Οι καλύτεροι διαλυτοποιητές ανάμεσα στις εμπορικά διαθέσιμες κυκλοδεξτρίνες αποτελούν οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες με χαμηλή μοριακή υποκατάσταση. Επίσης, η SBE-β-CD αποτελεί άριστο διαλυτοποιητή πολλών βιοδραστικών ενώσεων και είναι περισσότερο αποτελεσματική από τη φυσική β-CD.

Με την προσθήκη πολυμερών σε διαλύματα κυκλοδεξτρίνης επιτυγχάνεται σημαντική βελτίωση της διαλυτοποίησης βιοδραστικών ενώσεων. Η προσθήκη διαφόρων ρεολογικών παραγόντων (όπως τα υδατοδιαλυτά παράγωγα της κυτταρίνης) οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων με τις κυκλοδεξτρίνες και μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (Challa et al., 2005).

- Σταθερότητα

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη σταθερότητα των βιοδραστικών μορίων. Όταν ένα μόριο δεσμευτεί στο εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης παρεμποδίζει την είσοδο άλλων μορίων σε αυτήν. Αυτό οφείλεται σε φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης. Το μόριο σταθεροποιείται διότι εμποδίζεται η αντίδραση και η αλληλεπίδραση με άλλα μόρια.

Μια άλλη ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να βελτιώνουν τη σταθερότητα διαφόρων ασταθών βιοδραστικών ουσιών στην υδρόλυση, στην αφυδάτωση, στην οξείδωση και στη φωτοαποικοδόμηση. Αυτό επιτυγχάνεται είτε απομονώνοντας τη βιοδραστική ένωση από ένα πιθανό δραστικό περιβάλλον είτε εμποδίζοντας την αποικοδόμησή της μετά την απορρόφησή της.

- Επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα δυσδιάλυτων βιοδραστικών ενώσεων αυξάνοντας τη διαλυτότητα ή/και τη διαπερατότητα των βιοδραστικών ενώσεων από τις βιολογικές μεμβράνες. Σαν μόρια οι κυκλοδεξτρίνες είναι σχετικά μεγάλα (μοριακό βάρος μεταξύ 1000 και 1500) και υπό φυσιολογικές συνθήκες πολύ δύσκολα μπορούν να διαπεράσουν τις βιολογικές μεμβράνες. Όμως έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν τη διαπερατότητα δυσδιάλυτων, υδρόφοβων

βιοδραστικών ενώσεων κάνοντας τη βιοδραστική ένωση διαθέσιμη σε επιφάνειες με βιολογικούς φραγμούς (όπως το δέρμα, τη βλεννώδη μεμβράνη, τον κερατοειδή χιτώνα) απ' όπου εισέρχεται μέσα στη μεμβράνη χωρίς να διασπάσει τα λιπιδικά στρώματα αυτής. Επίσης, η προσθήκη πολυμερών μπορεί να προκαλέσει ακόμα περισσότερη αύξηση της διαπερατότητας των βιοδραστικών μορίων σε υδατικά διαλύματα κυκλοδεξτρίνης. Η αύξηση της σταθερότητας ασταθών βιοδραστικών ενώσεων από τις κυκλοδεξτρίνες, η ικανότητά τους να μειώνουν τον ερεθισμό που προκαλούν οι βιοδραστικές ενώσεις και η αύξηση του χρόνου παραμονής αυτών στο στάδιο της απορρόφησης στη ρινική, οπτική, ορθική και διαδερμική χορήγηση, είναι μερικοί ακόμα παράγοντες που συνεισφέρουν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών ενώσεων από τις κυκλοδεξτρίνες (Loftsson, et al., 2002, Challa et al., 2005).

- Επίδραση στην ασφάλεια των βιοδραστικών ενώσεων

Μια ακόμη δράση των κυκλοδεξτρινών είναι ότι μειώνουν την τοπική ερεθιστική δράση ορισμένων βιοδραστικών ενώσεων. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα που αποκτούν οι βιοδραστικές ενώσεις λόγω της συμπλοκοποίησης με κυκλοδεξτρίνες (αύξηση υδατοδιαλυτότητας), οδηγεί στη μείωση της ερεθιστικότητάς του κάνοντάς το θεραπευτικά αποτελεσματικό σε χαμηλότερες δόσεις (Nicolazzi et al., 2002, Loftsson and Brewster, 2010).

Σε μοριακό επίπεδο, η ενσωμάτωση της βιοδραστικής ένωσης στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης εμποδίζει την απευθείας επαφή του με τις βιολογικές μεμβράνες και έτσι μειώνει τις παρενέργειες και τον τοπικό ερεθισμό των ιστών χωρίς σημαντική μείωση των θεραπευτικών του ιδιοτήτων. Τέλος, η συμπλοκοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων που προορίζονται για οπτική χρήση, με τις κυκλοδεξτρίνες, μειώνει τον ερεθισμό που προκαλούν οι ενώσεις αυτές στο κερατοειδή χιτώνα περιορίζοντας τη συγκέντρωση της ελεύθερης βιοδραστικής ένωσης σε μη ερεθιστικά επίπεδα (Loftsson et al., 2005, Challa et al., 2005).

- Περιορισμός της πτητικότητας

Οι πτητικές βιοδραστικές ουσίες μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με κυκλοδεξτρίνες με σκοπό τη μείωση ή την εξάλειψη των απωλειών τους από την εξάτμιση.

Για παράδειγμα, η μενθόλη μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με τη β-κυκλοδεξτρίνη για το σχηματισμό ενός άοσμου συμπλόκου. Στους 100°C η ποσότητα της μενθόλης στο σύμπλοκο είναι πολύ κοντά στη θεωρητική συγκέντρωση αυτής ενώ η ελεύθερη μενθόλη υπό ίδιο συνθήκες θα είχε εξατμιστεί τελείως. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης σε αιθέρια έλαια και σε βελτιωτικά γεύσης φυτικής προέλευσης (Hegdes, 1998).

- Κάλυψη της δυσάρεστης γεύσης βιοδραστικών μορίων

Χαρακτηριστική ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητα τους να καλύπτουν τη τυχόν δυσάρεστη γεύση των βιοδραστικών μορίων ή και των λειτουργικών ομάδων αυτών. Μια δυσάρεστη γεύση που καθιστά ανεπιθύμητη τη λήψη των σκευασμάτων μπορεί να μειωθεί ή ακόμα και να εξαλειφθεί τελείως μετά τη συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες καθώς η δέσμευση των βιοδραστικών ενώσεων στην υδρόφοβη κοιλότητα εμποδίζει τη δέσμευσή τους από τους γευστικούς κάλυκες (Hegdes, 1998).

- Άλλες εφαρμογές

Στον τομέα των καλλυντικών, η χρήση των κυκλοδεξτρινών σκοπεύει στην σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων, των πτητικών συστατικών, στη μείωση των δυσάρεστων οσμών, στην αποφυγή της ταχείας οξείδωσης, στην ελεγχόμενη απελευθέρωση των αρωματικών υλών, στη μετατροπή υγρών συστατικών σε στερεά μορφή και στη βελτίωση της αντιμικροβιακής δράσης (Martin, 2004, Singh et al., 2002).

Στη γεωργία η χρήση των κυκλοδεξτρινών γίνεται για το σχηματισμό συμπλόκων με μια ευρεία ποικιλία αγροχημικών. Τα αγροχημικά αυτά περιλαμβάνουν ουσίες όπως είναι οι φυτορυθμιστικές, τα ζιζανιοκτόνα και τα εντομοκτόνα, τα εντομοαπωθητικά, τα μυκητοκτόνα και οι φερομόνες.

Στον τομέα της αναλυτικής χημείας βρίσκουν εφαρμογή σε τεχνικές χρωματογραφίας ως πρόσθετα στην κινητική ή στην σταθερή φάση. Ο στόχος είναι η βελτίωση της ικανότητας διαχωρισμού και στην ταχύτητα ανάλυσης. Επίσης, χρησιμοποιούνται στις φασματοσκοπικές τεχνικές όπως NMR και κυκλικός διχρωϊσμός καθώς και στην ηλεκτροχημεία (Li and Purdy, 1992).

Τέλος, στη χημική βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως χηλικά σύμπλοκα ενώ στο περιβάλλον για τη δέσμευση και απομάκρυνση οργανικών ρυπαντών και βαρέων μετάλλων από το έδαφος, το νερό και την ατμόσφαιρα (Baudin et al., 2000,).

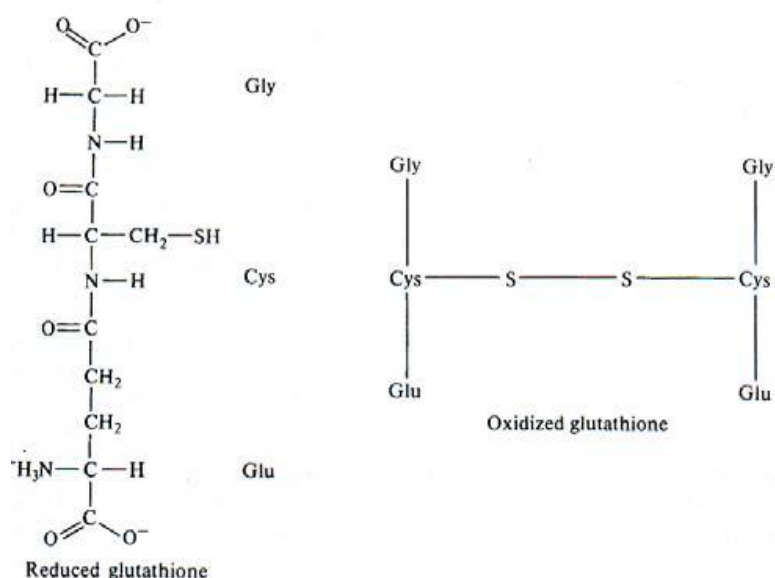
B. Τρανσφεράση/μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST enzyme)

1. Γλουταθειόνη (GSH)

Στα κύτταρα εντοπίζονται σημαντικές ποσότητες μη πρωτεϊνικών θειολών οι οποίες συμμετέχουν σε μοριακές, φυσιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων (Kunert and Foyer, 1993). Οι θειόλες αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά και εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA και πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ενζύμων. Το τριπεπτίδιο L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) ή GSH (**Εικόνα 9**) με μοριακό βάρος 307, αποτελεί τη σπουδαιότερη θειόλη που έχει βρεθεί τόσο σε φυτικά και ζωικά κύτταρα όσο και σε αερόβια βακτήρια (π.χ. στο *E. coli*) σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM (Foyer et al., 1994, Foyer and Noctor, 2011). Σπανιότερα μπορεί να ανιχνευτεί σε αναερόβια βακτήρια. Συντίθεται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο αντιδράσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το ATP και καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση γ-γλουταμυλοκυστεΐνης και συνθετάση της γλουταθειόνης. Σε κανονικές συνθήκες, η γλουταθειόνη υπάρχει σε ανηγμένη μορφή (GSH), που αντιστοιχεί στο 90-95% της ολικής ποσότητας γλουταθειόνης (Hayes et al., 2005, Wójcik et al., 2009). Ένα μικρό ποσοστό συναντάται και στην πλήρη οξειδωμένη μορφή της (GSSG-δισουλφίδιο της γλουταθειόνης) (**Εικόνα 9**) και προκύπτει ύστερα από την οξείδωση και το σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης (Tauszetal., 2004). Επίσης, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μόρια με μικρό μοριακό βάρος (π.χ. η ελεύθερη κυστεΐνη, το συνένζυμο A και οι θειολικές ομάδες πρωτεϊνών) (Sies, 1997, Hayes et al., 2005, Mendoza-Cózatl et al., 2005, Mendoza-Cózatl et al., 2008).

Η γλουταθειόνη, αποτελεί το πλέον κατάλληλο μόριο για τη διευθέτηση της θειολικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας που εξαρτάται από την αναλογία των θειολών προς τα δισουλφίδια (Mishra et al., 2008, Foyer and Noctor, 2011). Η παρουσία γ-πεπτιδικού

δεσμού σε ένα μόριο το καθιστά πιο ανθεκτικό στην αποικοδόμηση με τη βοήθεια αμινοπεπτιδασών.



Εικόνα 9: Η δομή της γλουταθειόνης και του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης. Η GSH είναι ένα τριπεπίδιο (γ-γλουταμινικό οξύ-κυστεΐνη-γλυκίνη). Στο GSSG δύο μόρια GSH συνδέονται με δισουλφιδική γέφυρα μέσω των-SH ομάδων των κυστεϊνών (Halliwell and Gutteridge, 1999, Mishra et al., 2008).

Η γλουταθειόνη είναι ευρέως διαδεδομένη τόσο σε κατώτερους όσο και σε ανώτερους οργανισμούς (Noctor et al., 1998, Soranzo et al., 2004). Θεωρείται ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (Mendoza et al., 2005, Schroer et al., 2011). *In vitro*, η γλουταθειόνη μπορεί να αντιδράσει άμεσα εξουδετερώνοντας ουσίες όπως η ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο (Gechev et al., 2006, Schroer et al., 2011). Ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (May et al., 2003). Ο κύκλος γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων είναι γνωστός ως κύκλος Foyer-Halliwell-Asada (Halliwell and Gutteridge, 1999, Herbette et al., 2007). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις για συμμετοχή στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε

κάποια συστήματα μεμβρανών (Makar et al., 1994, Edwards and Dixon 2005, Szalai et al., 2009). Γενικότερα, εμποδίζει την οξειδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η GSH αναστέλλει την καταλάση (Freitas et al., 2007) ενώ εμπλέκεται και σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων, στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (Sies, 1997, Srivalli and Khanna-Chopra, 2011).

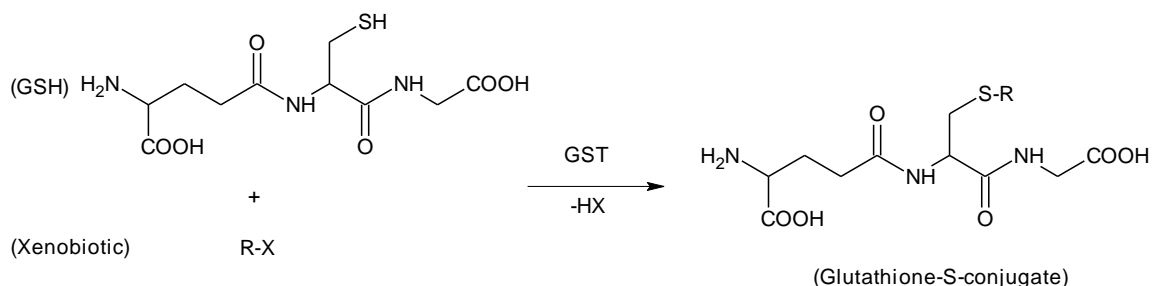
2. Μεταφορές της γλουταθειόνης (GSTs)

Οι μεταφορές της γλουταθειόνης (glutathioneS-transferases, GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου αδρανοποιώντας εξωγενείς ή ενδογενείς τοξικούς παράγοντες, δημιουργώντας μορφές λιγότερο βλαβερές (Zhang and Ge, 2008, Ekmekci et al., 2011). Οι έρευνες για GSTs είναι πολύ σημαντικές διότι εμπλέκονται στην δημιουργία φαρμάκων για διάφορες ανθρώπινες ασθένειες (Πάρκινσον, Αλσχάϊμερ, καταρράκτης των ματιών, γήρανση κύρωση του ήπατος, λευχαιμία κτλ.).

Πρώτη φορά εντοπίστηκαν πριν από 40 χρόνια στον αραβόσιτο, ενώ μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς και απαντούν ως ισοένζυμα (Soranzo et al., 2004, Oztetik, 2011). Οι μεταφορές της γλουταθειόνης είναι γενικά ομο- ή ετεροδιμερή και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν και μεμβρανικά ισοένζυμα, το κάθε ένα από τα οποία παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα (Halliwell and Gutteridge, 1999, Gill and Tuteja, 2010).

Οι GSTs των φυτών έχουν μελετηθεί πολύ για την ικανότητα που παρουσιάζουν στο να διασπούν ζιζανιοκτόνα (Moons, 2005, Powles and Yu, 2010). Αυτά τα ένζυμα όμως παρουσιάζουν έλλειψη εξειδίκευσης προς ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα ενώ μπορούν να λειτουργούν ως καταλύτες σύζευξης με ένα μεγάλο φάσμα ενώσεων, όπως αλκυλο και αρυλο αλογονίδια, εποξειδία, υδροϋπεροξειδία, οργανικά νιτρικά άλατα, θεικοί και φωσφορικοί εστέρες (Powles and Yu, 2010). Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα ένζυμα αυτά είναι η συμπλοκοποίηση της γλουταθειόνης (GSH) με μια μεγάλη ποικιλία ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, είτε ξενοβιοτικών είτε ενδογενών. Συγκεκριμένα,

καταλύουν την πυρηνόφιλη προσβολή της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο R μιας ένωσης, όπως την αντίδραση που παρουσιάζεται παρακάτω (**Εικόνα 10**):



Εικόνα 10: Αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής της GSH στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο μιας ένωσης RX. Όπου R: αλειφατική, αρωματική ή ετεροκυκλική ένωση, X: σουλφυδρυλική, νιτρώδες ή ομάδα με αλογόνο, R-GS: προϊόν σύνδεσης της ομάδας R με τη γλουταθειόνη (Edwards and Dixon, 2000, Powles and Yu, 2010).

2.1 Δομή των GSTs

Οι GSTs είναι ένζυμα της τάξης των 50,000Da, αποτελούμενα από δύο υπομονάδες μοριακής μάζας 20-28 kDa η καθεμία και σχηματιζόμενα από 250-250 αμινοξικά κατάλοιπα (Edwards and Dixon, 2000, Sheehan et al., 2001, Soranzo et al., 2004). Σε κάθε υπομονάδα του διμερούς υπάρχουν δύο ανεξάρτητες περιοχές δέσμευσης υποστρώματος: μια εξειδικευμένη περιοχή (G-θέση) που δεσμεύει τη GSH στην άμινο-N τελική δομική ενότητα και μια μη εξειδικευμένη περιοχή (H-θέση) στην οποία δεσμεύονται τα υδρόφοβα ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα στην κάρβοξυ τελική-C δομική ενότητα (αποτελεί το ένα τρίτο της πρωτεΐνης) (Edwards and Dixon, 2005). Οι περιοχές αυτές ενώνονται με ένα μικρό ευμετάβλητο τμήμα που φέρει 5-10 κατάλοιπα.

2.2 Ταξινόμηση των GSTs

Οι GSTs διακρίνονται σε τρεις διακριτές υπεροικογένειες:

- Κυτταροπλασματικές GSTs

Με βάση την αμινοξική τους ακολουθία μπορούν να διαχωριστούν σε έναν αριθμό τάξεων (Mannervik and Danielson, 1988, Dirr et al., 1994). GSTs που εντοπίζονται στα θηλαστικά χωρίζονται στις παρακάτω τάξεις: alpha (A), mu (M), pi (P), theta (T), zeta (Z), omega (O), sigma (S), kappa (K) (Hayes and Pulford 1995, Frova, 2003). Οι περισσότερες μελετημένες κυτταροπλασματικές GSTs στα θηλαστικά είναι alpha (A), mu (M), pi (P) (Dourado et al., 2008). Επιπλέον τάξεις GSTs έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς. Στα έντομα έχουν βρεθεί: δ (D, delta) και ε (epsilon), στα φυτά οι τάξεις : φ (F, phi), τ (T, tau), λ (L, lambda), δεϋδροασκορβική αναγωγή (DHAR) (Dixon et al., 2002, Enayati et al., 2005) και στα βακτήρια οι τάξεις: β (beta) και χ (chi). Στα φυτά έχουν βρεθεί, επίσης, εκπρόσωποι των τάξεων θ, ζ (Droog, 1997, Edwards and Dixon, 2000, Sheehan et al., 2001, Wikteliu and Stenber, 2007) που βρίσκονται και στα ζώα αλλά και στους μύκητες (Fritz-Wolf et al., 2003). Τα μέλη της υπεροικογένειας των κυτταροπλασματικών GSTs συνεχώς αυξάνονται λόγω της συνεχούς αύξησης των γενετικών πληροφοριών και έτσι έχει δημιουργηθεί και μια ονομαζόμενη U τάξη που περιέχει έναν αριθμό καινούριων μη ταξινομημένων GSTs (Ding et al., 2003, Dourado et al., 2008). Γενικά μέλη της ίδιας τάξης παρουσιάζουν μεγαλύτερη από 40-50 % ομολογία ως προς τη νουκλεοτιδική τους ακολουθία αλλά μικρότερη από περίπου 25-30 % ομολογία με GSTs άλλων τάξεων (Hayes and Pulford, 1995, Frova, 2006, Li et al., 2009).

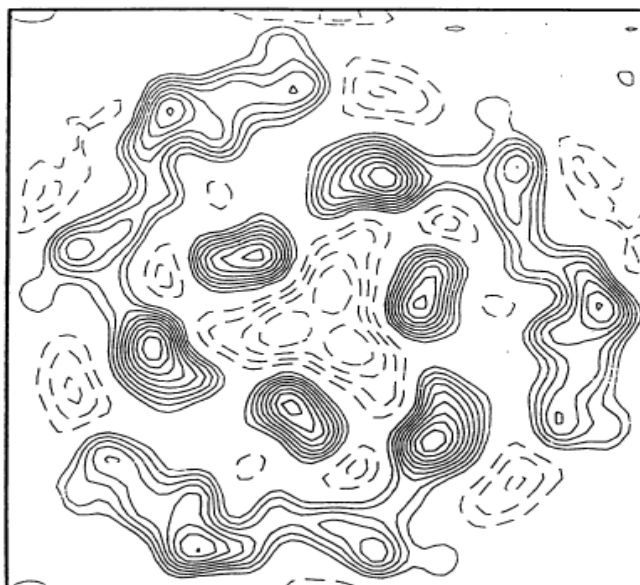
- Μιτοχονδριακές GSTs

Προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη, η οποία εμποδίζει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης μπλοκάροντας το σχηματισμό του N- άκυλο-μουραμικού οξέος. Πρόκειται για μη συνηθισμένα ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των μεταλλοενζύμων (Arca et al., 1980, Arca et al., 1990). Έχει παρατηρηθεί ότι δεν έχουν καμία ομοιότητα με τις κυτταροπλασματικές GSTs και ότι καταλύουν διαφορετικές κατηγορίες χημικών αντιδράσεων (Bernat, 1997, Gallagher

et al., 2006). Αν και χημικά οι αντιδράσεις αυτές είναι τελείως διαφορετικές, όλες πιθανόν να πραγματοποιούνται με τη συμμετοχή ενός μετάλλου της ενεργής περιοχής, που σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση ή κάποιο ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης. Η πρωτοταγής δομή τους δε σχετίζεται με καμία από τις άλλες οικογένειες των GSTs και επίσης δεν καταλύουν την προσθήκη της GSH σε συνήθη ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (Arca, 1990, Aniya and Imaizumi, 2011).

- Μεμβρανικές μικροσωμικές

Εντοπίζονται πάνω στις μεμβράνες γι αυτό και ονομάζονται μεμβρανικές. Δομικά τα ένζυμα αυτά είναι τριμερή με τρεις μη αλληλεπιδρούσες ενεργές περιοχές (Εικόνα 11) και παρουσιάζουν ομοιότητα με ένζυμα όπως η συνθάση του λευκοτριενίου C4 και η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της 5-λιποξυγονάσης (Bernat, 1997, Nebert, and Vasiliou, 2004). Διαφέρουν με τις κυτταροπλασματικές GSTs κυρίως στις ανοσολογικές ιδιότητες. Μέλη της οικογένειας αυτής έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό τοξικών ξενοβιοτικών ουσιών. Οι μικροσωμικές GSTs έχουν χαρακτηριστεί περισσότερο στα θηλαστικά τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Μέλη των μικροσωμικών GSTs έχουν βρεθεί σε φυτά, σε μύκητες και σε βακτήρια (Ford-Hutchinson et al., 1990).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση μιας τριμερούς μικροσωμικής GST. Το ένζυμο αποτελείται από έναν πυρήνα με 6α έλικες που σκιαγραφούν μια κεντρική περιοχή με χαρακτηριστική πυκνότητα (διακεκομμένες γραμμές). Ο πυρήνας περικυκλώνεται από τρεις επιμήκεις περιοχές (Hebert et al., 1995)

2.3 Τρανσφεράση της γλουταθειόνης hGSTA1-1

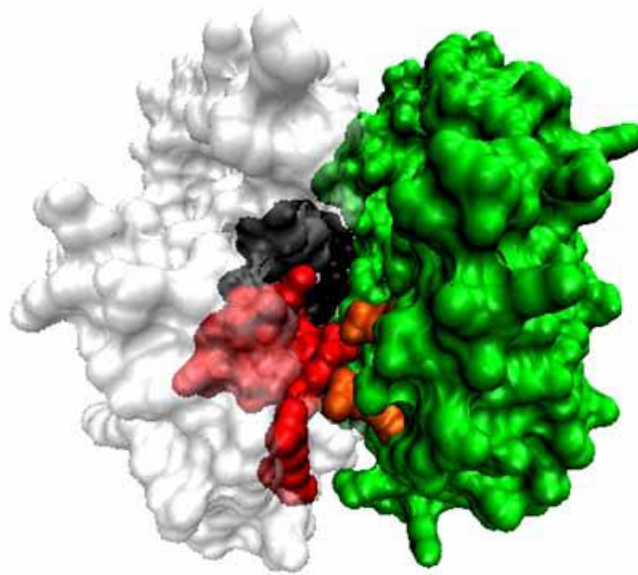
Οι GSTs της α τάξης των θηλαστικών, λόγω του σημαντικού αποτοξινωτικού τους ρόλου, αποτελούν μια από τις πιο μελετημένες GSTs τάξεις. Στις GSTs της α τάξης του ανθρώπου, ανήκουν 5 γονίδια hGSTA1-hGSTA5 (hGSTA1, hGSTA2, hGSTA3, hGSTA4, hGSTA5) (Lietal., 2009) και 7 ψευδογονίδια (hGSTAP1, hGSTAP2, hGSTAP3, hGSTAP4, hGSTAP5, hGSTAP6, hGSTAP7) (Morel et al., 2003). Οι hGSTA1-hGSTA4 έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί ως γονίδια, ως CDNA και ως πρωτεΐνες (Suzuki et al., 1994, Morel et al., 1994, Adnan, 2012). Το γονίδιο hGSTA5 δεν έχει ακόμα απομονωθεί ως γονιδιακό προϊόν (Morel et al., 2003, Kurtovic et al., 2008, Singh et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το ένζυμο GSTA1-1. Η δομή του ενζύμου παρουσιάζεται στην **Εικόνα 12**. Η GSTA1-1 αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο με καταλυτική δραστηριότητα έναντι πολλών δομικών διαφορετικών υποστρωμάτων

(Blikstad et al., 2008). Είναι το κύριο ισοένζυμο που συναντάται στο ανθρώπινο ήπαρ, και αντιπροσωπεύει το 2% της ολικής πρωτεΐνης που συναντάται εκεί (Blikstad et al., 2008, Knight et al., 2008). Βρίσκεται επίσης σε αφθονία στο νεφρό και σε διάφορους άλλους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Fritz-Wolfetal., 2003, Knight et al., 2008). Έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης διότι αποτοξινώνει καρκινογόνους μεταβολίτες, περιβαλλοντικούς ρύπους, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες διολ-εποξειδίων και χημειοθεραπευτικά αντιδραστήρια (π.χ busulphan, chlorambucil, melphalan) (Coles and Kadlubar, 2005). Αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο λόγω της GPx δράσης του έναντι των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων (Tew and Townsend, 2012). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα ένζυμα hGSTA1-1 και hGSTA2-2 αποτελούν τους κυριότερους ρυθμιστές στα επίπεδα των λιπαρών υπεροξειδίων (LPO) κατά την παραγωγή τους από την οξειδωτική καταπόνηση των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων στους οπτικούς φακούς (Tew and Townsend, 2012).

Το hGSTA1-1 αποτελείται και από μη καταλυτικά κέντρα δέσμησης (ligandinsites) ενδογενών και εξωγενών ενώσεων (Balchin et al., 2012). Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι τοξικές όπως είναι οι ανενεργοί μεταβολίτες που δημιουργούνται από καρκινογόνες ουσίες αλλά και ενδογενή υποστρώματα όπως η αίμη και η χολυρεθρίνη (Arias et al., 1980).

Η Α τάξη των ισοενζύμων των GSTs αποτελούν ένζυμα των 50,000Da με δύο υπομονάδες μοριακής μάζας 26 kDa η καθεμία και σχηματίζονται από 250-250 αμινοξικά κατάλοιπα. Είναι είτε ομοδιμερές είτε ετεροδιμερές (GSTA1, A2, A3, και A4) (Huber et al., 1997, Prade et al., 1998, Okada et al., 2001, Dixon et al., 2002, Cocco et al., 2012). Κάθε υπομονάδα του hGSTA1-1 αποτελείτε από ένα ενεργό κέντρο με μια πολική και υψηλά εξειδικευμένη θέση δέσμησης της γλουταθειόνης (g-θέση). Επίσης διαθέτει και μια γειτονική υδρόφοβη και λιγότερο εξειδικευμένη θέση δέσμησης των υποστρωμάτων με ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα.



Εικόνα 12: Παρουσίαση τρισδιάστατης δομής του μονομερούς του ένζυμου GSTA1-1 (το ένζυμο είναι ομοδιμερές της τάξης alpha (A) της υποοικογένειας 1). Άσπρο: N τελική δομική περιοχή, πράσινο: C τελική δομική περιοχή, μαύρο: H- θέση, κόκκινο: G- θέση.

2.4 Ρόλοι και καταλυτικές λειτουργίες των GSTs

Τα ένζυμα GSTs είναι γνωστά κυρίως ως ένζυμα αποτοξίνωσης (Hebert et al., 1995, Navrot et al., 2007). Η μεταβολική αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών ή των ξένων οργανικών ενώσεων είναι μια γνωστή διαδικασία σε διάφορους οργανισμούς και έχει ευεργετικούς ρόλους στην αποτοξίνωση των διαιτητικών τοξινών και των καρκινογόνων οργανικών ρύπων. Επίσης, είναι πασίγνωστα για το ρόλο τους στην αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα καρκίνου, σε εντομοκτόνα, σε μυκητοκτόνα και σε μικροβιακά αντιβιοτικά (Edwards et al., 2000, Navrot et al., 2007, Romero et al., 2012)

Γενικότερα, όμως, έχει τεκμηριωθεί ένας αριθμός μη καταλυτικών λειτουργιών των GSTs όπως η:

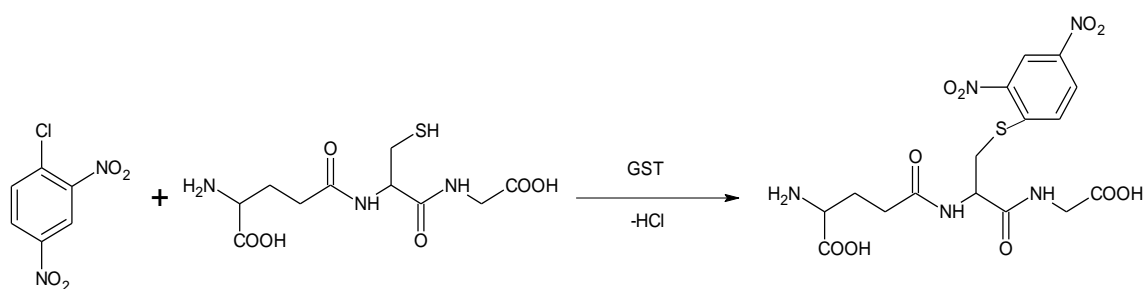
- ενζυμική αποτοξίνωση μέσω συμπλοκοποίησης με γλουταθειόνη
- ο ρόλος των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση

- ενδοκυτταρική μεταφορά φυσικών μεταβολιτών από GSTs
- θεραπευτική σήμανση ασθενειών
- κατάλυση αντιδράσεων βιομετατροπής που εξαρτώνται από τη γλουταθειόνη

2.5 Υποστρώματα των GSTs

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας όλων των GSTs χρησιμοποιούνται υποστρώματα τα οποία είναι είτε συνθετικές χημικές ενώσεις είτε ζιζανιοκτόνα. Η νουκλεόφιλη υποκατάσταση ενός αλκυλ- ή αρυλαλογονιδίων ή νιτρο-ομάδων είναι η πιο γνωστή από τις αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα αυτά. Τα αλογονίδια ή οι νιτρο-ομάδες των υποστρωμάτων είναι ήπια ηλεκτρονιόφιλα και αντιδρούν εύκολα με τη γλουταθειόνη.

Η συνήθης ενζυμική δοκιμή που γίνεται για τη μέτρηση δραστηριότητας της GST είναι με το υπόστρωμα 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο, καθαρότητας 98%, (CDNB) (**Εικόνα 13**). Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) είναι φωτομετρικός και βασίζεται στη μέτρηση της παραγωγής του συμπλόκου S-(DNP) GS που απορροφά στα 340nm κατά την αντίδραση της GSH με το αντιδραστήριο CDNB (Mannervik and Guthenberg, 1981, Higgins and Hayes 2011).



Εικόνα 13: Αντίδραση της GST με το υπόστρωμα CDNB

3. Ενζυμική σταθερότητα

3.1 Το πρόβλημα της σταθερότητας των ενζύμων και οι παράγοντες που συμβάλλουν στην αδρανοποίησή τους.

Τα ένζυμα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο σε επίπεδο εφαρμογών διότι η χρήση τους σε τομείς όπως η έρευνα και η βιομηχανία σχετίζεται άμεσα. Επίσης, η χρήση τους στον τομέα της χημείας είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για την οργανική σύνθεση πολύπλοκων ενώσεων και πολυμερών. Η πλειονότητα των χημικών παρασκευασμάτων της καθημερινής ζωής (π.χ απορρυπαντικά) στηρίζεται κατεξοχήν στη χρήση ενζύμων. Τα τελευταία χρόνια η χρήση των ενζύμων γνωρίζει έξαρση σε τομείς όπως η βιοτεχνολογία, η φαρμακευτική και η ιατρική. Αξίζει να αναφερθεί η χρήση των βιοαισθητήρων με σκοπό την ανίχνευση της υπολειμματικής δράσης κάποιων χημικών και τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής τους (Gibson, 1999, Snyder et al., 2011).

Ένα από τα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστεί σε επίπεδο εφαρμογής των ενζύμων είναι η σταθερότητα τους (Wu, 1931, Gershenson and Arnold, 2000, Iyer and Ananthanarayan, 2008). Η αστάθεια ορισμένων ενζύμων τα καθιστά δομικά ευμετάβλητα οδηγώντας στην ολική ή εν μέρει αδρανοποίηση τους, είτε βραχυπρόθεσμα είτε μακροπρόθεσμα.

Η σταθερότητα που χαρακτηρίζει τα ένζυμα μπορεί να διαχωριστεί σε δύο είδη (Wu, 1931, Gershenson and Arnold, 2000).

- στην σταθερότητα αποθήκευσης
- στη λειτουργική σταθερότητα

Η σταθερότητα αποθήκευσης αφορά στη διάρκεια ζωής και στη δραστικότητα ενός ενζύμου με αποθήκευση αυτού σε συγκεκριμένες συνθήκες. Αυτό το χαρακτηριστικό καθορίζει εάν ένα ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και υπό ποιες συνθήκες στο εμπόριο.

Η λειτουργική σταθερότητα αφορά στη διατήρηση της δράσης ενός ενζύμου όταν αυτό χρησιμοποιείται στα πλαίσια μιας εφαρμογής. Ιδιαίτερα όπου η χρήση των ενζύμων σχετίζεται άμεσα με την υγεία του ανθρώπου εύλογα προκύπτει η μεγάλη σημασία της μελέτης και της γνώσης της σταθερότητας αυτών των μορίων.

Η μελέτη αυτών των μηχανισμών είναι σύνθετη και πολύπλοκη και εξαρτάται από τη δομή και αλληλουχία του ενζυμικού μορίου όπως επίσης και από τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του (ύπαρξη συμπαραγόντων για εκδήλωση της δράσης, μεταλλικών ιόντων, σακχάρων κ.τ.λ.). Οι καθοριστικοί και οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αδρανοποίησης των ενζύμων εντάσσονται κατά των πλείστων στα πλαίσια της αμιγώς χημικής μη αναστρέψιμης μεταβολής (Rhodes et al., 1992, Haran, 2011) και είναι οι εξής:

- Ξετύλιγμα της τεταρτοταγούς δομής ενός ενζύμου (Unfolding).
- Απώλεια κάποιου συμπαραγόντα απαραίτητου για την ενζυμική δράση (FAD, NAD κ.τ.λ.).
- Πρωτεϊνική συσσωμάτωση (protein aggregation).
- Μη αντιστρεπτή αναστολή (irreversible inhibition).
- Πρωτεόλυση (proteolysis).
- Μη αντιστρεπτή μεταβολή της χημείας ενός πρωτεϊνικού μορίου.
- Υδρόλυση κάποιων αμινοξέων (γλουταμινικό, ασπαραγινικό).
- Σχηματισμός κυκλικού ιμιδίου σε κάποια αμινοξέα μέσω συμπύκνωσης (ασπαραγίνη, γλουταμίνη).
- Απώλεια σακχάρου ορισμένων γλυκοζυλιωμένων ενζύμων.
- Απώλεια αμιδικής ομάδας κάποιων αμινοξέων (ασπαραγίνη, γλουταμίνη).
- Οξειδωση αμινοξέων όπως τρυπτοφάνης, μεθειονίνης, κυστεΐνης, τυροσίνης.
- Αποδιάταξη δισουλφιδικών δεσμών που συνεπάγεται αποσταθεροποίηση της πρωτεϊνικής δομής.

- Φωτοοξειδωση.

Ορισμένοι από τους παραπάνω μηχανισμούς μπορεί να λάβουν μέρος τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και να οδηγήσουν σε ενζυμική αδρανοποίηση. Το ενδιαφέρον όμως στα πλαίσια της μελέτης της σταθερότητας αποθήκευσης και της λειτουργικής σταθερότητας μακροπρόθεσμα συγκεντρώνεται στην *in vitro* μελέτη των παραπάνω μηχανισμών και στην αναζήτηση τρόπων, οι οποίοι θα οδηγήσουν στον περιορισμό αυτών των φαινομένων ενώ ταυτόχρονα θα προωθήσουν την αύξηση και βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων γενικότερα.

3.2 Μέθοδοι βελτίωσης της ενζυμικής σταθερότητας.

Η δυνατότητα διατήρησης της ενζυμικής σταθερότητας για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτελεί ζήτημα ζωτικής σημασίας για τις σύγχρονες εφαρμογές των ενζύμων τόσο σε εμπορικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Ο τομέας αυτός αποτελεί ένα σημαντικό αντικείμενο μελέτης και συσπειρώνει το ερευνητικό ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. Απόρροια του μεγάλου αριθμού ερευνών αποτέλεσε η ανάπτυξη πολλών και διαφορετικών μεθόδων βελτίωσης της ενζυμικής σταθερότητας, όσον αφορά τη σταθερότητα αποθήκευσης και τη λειτουργική σταθερότητα (Klibanov, 1979, Montalvo-Ortizetal., 2012). Τέτοιες μέθοδοι είναι η πρωτεϊνική μηχανική και η χημική τροποποίηση του πρωτεϊνικού μορίου. Η μέθοδος της ακινητοποίησης αποτελεί μια από τις κυριότερες μεθόδους που έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και αποτελούν τη βάση ανάπτυξης πολλών εφαρμογών. Ακινητοποίηση ενός βιοκαταλύτη (ενζύμου, βιομορίου, ακόμη και ολόκληρου κυττάρου) είναι ο περιορισμός του σε μια τεχνητή, αδρανή και σταθερή στερεή φάση μέσα από την οποία εκδηλώνει τη δράση του (Turneretal, 1987, Tischer and Wedekind, 1999, Díez et al., 2012). Η στερεή αυτή φάση διαχωρίζεται από την υγρή, μεταβλητή φάση στην οποία συγκεντρώνονται τα υποστρώματα και τα προϊόντα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ετερογενούς συστήματος.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου αποτελούν:

- Η δυνατότητα της άμεσης και γρήγορης παραλαβής του προϊόντος της κατάλυσης εφόσον το ένζυμο και το προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις.
- Η εύκολη επέμβαση και έλεγχος της αντίδραση μέσω απλής προσθήκης ή αφαίρεσης υποστρώματος ή και βιοκαταλύτη.
- Η εξοικονόμηση σημαντικής ποσότητας βιοκαταλύτη διότι μετά το τέλος της αντίδρασης δύναται η επαναχρησιμοποίησή του πολλές φορές.
- Η επίτευξη της συνεχόμενης λειτουργίας της αντίδρασης που συνεπάγεται σε εξοικονόμηση χρόνου.

Για την ακινητοποίηση ενός βιοκαταλύτη χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία εντάσσονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες που είναι οι χημικές και οι φυσικές τεχνικές ακινητοποίησης (Mateo et al., 2007, Brady and Jordaan, 2009).

Στις χημικές τεχνικές ακινητοποίησης, κατά τη διάρκεια της χημικής αντίδρασης δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του βιοκαταλύτη και του φορέα της στερεής φάσης ή μεταξύ των μορίων του ίδιου του βιοκαταλύτη (δημιουργία βιοκαταλυτικής στερεάς φάσης), (Schmid et al., 2002, Montalvo-Ortizetal., 2012). Στις φυσικές τεχνικές ακινητοποίησης ο βιοκαταλύτης προσροφάται στο φορέα με τη βοήθεια ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή εγκλωβίζεται εντός ενός τεχνητού χώρου, ο οποίος αποτελεί και το μικροπεριβάλλον του συστήματος. Τέτοιου είδους μικροπεριβάλλον δημιουργείται από κάποια πλέγματα πολυμερών, μικροκαψυλλίων ή και λιποσωμάτων. Η επιλογή της τεχνικής ακινητοποίησης εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής που επιθυμεί κάποιος να αναπτύξει και επίσης κατά πόσο τα χαρακτηριστικά της επιλεγμένης τεχνικής τον εξυπηρετούν στο έργο του (Schmid et al., 2002, Brady and Jordaan, 2009).

Επίσης, η επιλογή βασίζεται και στις ιδιότητες του υπό μελέτη βιοκαταλύτη. Μια χημική ακινητοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε καταλυτική αδρανοποίηση ενός ευαίσθητου ενζύμου και γι αυτό θα οδηγήσει στην επιλογή μιας φυσικής ακινητοποίησης. Η βιβλιογραφία είναι γεμάτη από περιπτώσεις ακινητοποίησης βιοκαταλυτών όπως επίσης και από παραλλαγές των βασικών τεχνικών.

Κεφάλαιο 2

Πειραματικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

1. Εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (ορατού-υπεριώδους) της εταιρείας Hitachi (μοντέλο U-2000, με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm) με θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας. Χρησιμοποιήθηκε για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηρότητας.
- Η πεχαμέτρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε με χρήση της συσκευής ORION 410A.
- Ο καθαρισμός του ενζύμου έγινε με τη βοήθεια του προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B.
- Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific.
- Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου έγινε σε συσκευή του οίκου

2. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα

2.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων και σχετικά αντιδραστήρια

- LBυγρό θρεπτικό υλικό

0,5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl, 1% πεπτόνη. Για στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται 1,5% άγαρ.

- IPTG (ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο)

238,3mg/mL σε δις απιονισμένο νερό (ddH₂O). Αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2 Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

Για την παρασκευή 3mL διαλύματος αναμιγνύονται 150μL 0,5M Tris-HCL, pH 8, 60μL 0,5M EDTA, pH 8 και 75μL 2M γλυκόζης.

- Διάλυμα NaOH/SDS

Για την παρασκευή 5mL διαλύματος αναμιγνύονται 114μL 10M NaOH και 568μL 10% SDS.

- Διάλυμα CH₃COONH₄/RNάσης A

Για την παρασκευή 4,5mL διαλύματος αναμιγνύονται 4,5mL CH₃COONH₄ 7,5M, pH 7,8 και 45μL διαλύματος RNάσης A.

- RNάσης A

Διάλυμα RNάσης A 10mg/mL σε 10mM Tris-HCL pH 7,4, 15mM NaCl. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο 100°C για 15min και αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) φυλάσσεται στους -20°C.

2.3 Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x

Αποτελείται από 0,25M Tris, 1,29M γλυκίνη και 1% SDS, pH 8,3. Διάλυμα 1L περιέχει 30,3g Tris-base, 144g γλυκίνη, 10g SDS.

- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού

Αποτελείται από 3M Tris-HCL, pH 8.8

- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβαξης

Το διάλυμα αποτελείται από 0,5M Tris-HCL, pH 6,8

- Διάλυμα ακρυλαμίδιου

Ακρυλαμίδιο 30g, 42mmol και N,N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο 0,8g, 5,2mmol, διαλύονται σε 100mL ddH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο δοχείο στους 4°C.

- Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Αποτελείται από 0.125M Tris-HCL, pH 6.8, 4% SDS, 20% γλυκερόλη και 10% β-μερκαπτοαιθανόλη.

- Διάλυμα SDS

10% SDS.

- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου

1.5% υπερθειικό αμμώνιο. Παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά που γίνεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

3. Μέθοδοι

3.1 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου μεταφοράση της γλουταθειόνης σε κύτταρα *E.coli*.

Η καλλιέργεια των κυττάρων για την έκφραση του επιθυμητού ενζύμου πραγματοποιείται εντός φιαλών Erlenmeyer σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, η σύσταση του οποίου ήταν: 1% πεπτόνη, 1% NaCl και 0,5% εκχύλισμα ζύμης. Επιπλέον περιέχονται και τα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και καναμυκίνη στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των 100 και 50mg/mL.

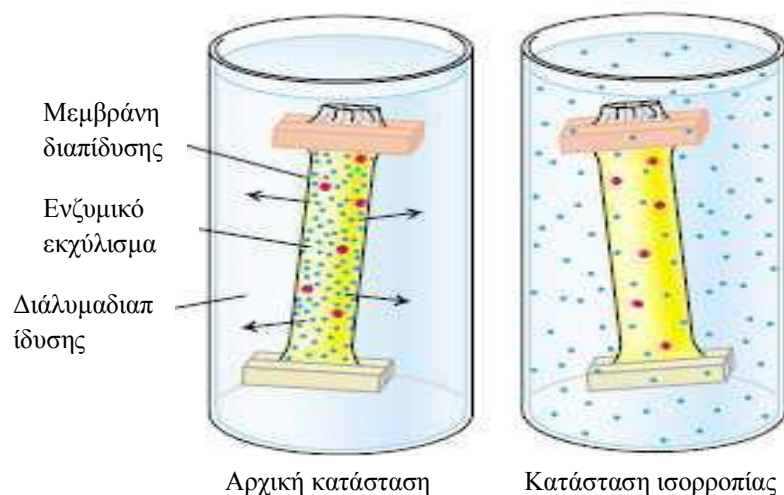
Η διαδικασία έχει ως εξής: θρεπτικό μέσο όγκου 500mL εμβολιάζεται με 50mL κατάλληλα μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* τα οποία προέρχονται από ολονύκτια επώαση 12-16h στους 37°C υπό συνθήκες ανάδευσης. Τη χρονική στιγμή κατά την οποία η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας είναι περίπου 0,6-0,7 στα 600nm, προσθέτουμε IPTG συγκέντρωσης 1mM ώστε να επαχθεί η έκφραση του ενζύμου. Από αυτό το στάδιο και έπειτα η ανάπτυξη της καλλιέργειας συνεχίζεται για 4h. Μετά από τις τελευταίες 4h, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 8000rpm για 20min στους 4°C με αποτέλεσμα τη συλλογή των κυττάρων και την απομάκρυνση του περιττού πλέον θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C έως την επαναχρησιμοποίησή τους.

3.2 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.

Επιθυμητή ποσότητα κυτταρικής μάζας αιωρείται στο τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50mM φωσφορικών KH_2PO_4 pH 7,3. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την επίδραση υπερήχων. Η επίδραση αυτή ακολουθείται 4 φορές διάρκειας 15s η καθεμία με ένα μεσοδιάστημα ενός λεπτού. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τα μεσοδιαστήματα το δείγμα μεταφέρεται σε πάγο ($2-4^\circ\text{C}$) προς αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών λόγω της παραγόμενης θερμότητας από τους υπέρηχους. Το τελικό αιώρημα το οποίο έχει πλέον αυξημένο ιξώδες, φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 5min και συλλέγουμε το υπερκείμενο.

3.3 Διαπίδυση

Τα ενζυμικά εκχυλίσματα πριν τον καθαρισμό υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι συνήθως 500 έως 1000 όγκων ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης και pH προκειμένου να αποκτήσουν την ίδια σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος και pH με αυτό της διαπίδυσης. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12kDa της εταιρίας Sigma-Aldrich (H.P.A.). Η διαδικασία αυτή διαρκεί 18-24h και πραγματοποιείται στους 4°C . Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται επίσης και η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος ($12 < \text{kDa}$).



Εικόνα 14: Απεικόνιση της διαπίδυσης ενζυμικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας ημιπερατή μεμβράνη σε κατάλληλο διάλυμα διαπίδυσης.

3.4 Σύνθεση προσροφητή συγγένειας 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B.

Σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose-CL6B), (20g), αφού πλύθηκαν με 200mL ddH₂O, προστίθενται σε διάλυμα 0.6M NaOH (20mL) προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αγαρόζη. Το αιώρημα αφήνεται για 3h υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C. Στην ενεργοποιημένη αγαρόζη προστίθενται 4mL 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C. Στη συνέχεια η αγαρόζη προστίθεται σε διάλυμα GSH 400μmL, το οποίο είναι διαλυμένο σε 1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, pH 8.

Η αντίδραση αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 42h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C. Ακολουθεί διήθηση και πλύσιμο με δεκαπλάσιο όγκο ddH₂O. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C εντός διαλύματος 20% αιθανόλης.

3.5 Καθαρισμός του ενζύμου hGSTA1-1 μέσω χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B.

Η διαδικασία του καθαρισμού του ενζύμου βασίστηκε στη χρωματογραφία συγγένειας η οποία αποτελεί την πιο εκλεπτυσμένη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμου. Η τεχνική βασίζεται στη βιολογική συγγένεια των ενζύμων να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο με μόρια δεσμευτές. Στη δική μας περίπτωση, το ένζυμο hGSTA1-1 συνδέεται εκλεκτικά με τη γλουταθειόνη (GSH) του προσροφητή. Τα κύρια χαρακτηριστικά της ήταν: ο προσροφητής που διέθετε όγκο 1,5mL εξισορροπείται με 20mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 50mM και pH 7. Στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα που περιέχει το ενζυμικό εκχύλισμα και η στήλη χρωματογραφίας παραμένει κλειστή για 10min ώστε να μεγιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με τη γλουταθειόνη και να συγκρατηθούν όλο και περισσότερα μόρια ενζύμου στη στήλη. Ακολουθεί πλύσιμο του προσροφητή με 15mL ρυθμιστικού και στη συνέχεια η ποσότητα του ενζύμου που προσδέθηκε εκλύεται με 10mL ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιέχει και 10mM γλουταθειόνη (GSH) pH 7. Η συνολική εκλούμενη ποσότητα παραλαμβάνεται σε κλάσματα του 1mL. Σε κάθε κλάσμα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του ενζύμου και κατόπιν όπου είναι επιθυμητό πραγματοποιούμε και ποσοτικό προσδιορισμό του ενζύμου με τη μέθοδο Bradford, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια.

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

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού και επιστοιβαξής είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (0,875mL) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (0,7mL) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2,9mL). Το μίγμα αραιώνεται με τη προσθήκη

νερού και ακολουθεί απαρέωση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15min. Μετά την απαρέωση προσθέτονται TEMED (6,25 μ L) και υπερθευικό αμμώνιο (0,160 mL). Το μίγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι με διαστάσεις 1,5 mm πάχος και 12cm βάθος. Η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με διάλυμα βουτανόλης κορεσμένης με νερό και αφήνεται να πολυμεριστεί για 1h στους 200-25 $^{\circ}$ C. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός απομακρύνεται το διάλυμα της βουτανόλης και εφόσον ξεπλυθεί με νερό η επιφάνεια της πηκτής, εισάγεται η πηκτική επιστοίβαξης, η παρασκευή της οποίας γίνεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτικής επιστοίβαξης (0,625mL) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50 μ L) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (0,625mL). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3,45mL) και στη συνέχεια απαιρώνεται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15min. Μετά την απαρέωση προσθέτεται TEMED (6,25 μ L) και υπερθευικό αμμώνιο (1mL). Το δείγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, εισάγεται στη κορυφή της πηκτής κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30min.

3.6.1 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.

Πρωτεϊνικό δείγμα συγκέντρωσης περίπου 50-100 μ g διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (~10 μ L) όπου θερμαίνεται στους 75-100 $^{\circ}$ C. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ως μάρτυρας η μπλε χρωστική της βρωμοκρεζόλης (0,02%). Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται (20-25 $^{\circ}$ C) υπό σταθερή ένταση 30 mA για κάθε πηκτή.

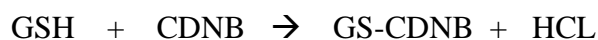
3.7 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από την ηλεκτροφόρηση με στόχο τη βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών. Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: κατόπιν της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40%), οξικό οξύ (7%) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,025-0,1%) όπου και επωάζεται για 1h περίπου. Ο αποχρωματισμός της πηκτής πραγματοποιείται μετά από επώαση 5h στο καθένα από τα επόμενα δύο υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν: α) μεθανόλη (50%) και οξικό οξύ (10%) και β) μεθανόλη (5%) και οξικό οξύ (7%).

4. Φωτομετρικός προσδιορισμός της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST).

4.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός της GST χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο CDNB και GSH.

Ο φωτομετρικός αυτός προσδιορισμός του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας δημιουργίας του συμπλόκου GS-CDNB μέσα από τη μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος αυτής της πρόσδεσης στα 340nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της ενζυμικής δράσης η οποία επιταχύνει τη παρακάτω αντίδραση:



Το μίγμα της αντίδρασης έχει όγκο 1 ml περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH_2PO_4 , pH 6,5, 2,5mM GSH, 1mM CDNB (Sigma, U.S.A.) καθώς και την ανάλογη ποσότητα GST (μετρημένη σε ενζυμικές μονάδες units/mL).

Ως ενζυμική μονάδα GST ορίζεται το ποσό του ενζύμου το οποίο απαιτείται για να καταλύσει τη μετατροπή 1μmL CDNB σε GS-CDNB στη μονάδα του χρόνου στους 37°C. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του συμπλόκου GS-CDNB επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που είναι 9,6 l/mmolcm.

5. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά Bradford (1976).

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

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Η χρωστική (100mg) διαλύεται σε 100mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50%). Στο διάλυμα προστίθενται 100mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85%). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο διατηρείται στους 25°C. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία ¼ και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25°C για 24h.

Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης, σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25°C για 20-35min σε σκοτεινό μέρος και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595nm, έχοντας ως αναφορά διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη (σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL δις αποσταγμένου νερού). Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας ως πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10mg) αλβουμίνης από ορό μόσχου.

6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής κινητικής έγινε χρήση του προγράμματος Grafit3 (Erithacus Software Limited, Version 3.6). Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής δραστηριότητας, της επίδρασης του pH, της θερμοσταθερότητας, του σημείου τήξεως T_m , της θερμοδυναμικότητας, της επίδρασης της ουρίας και της χυμοθριψίνης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel 2007 της εταιρίας Microsoft με λογισμικό Windows 7.

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

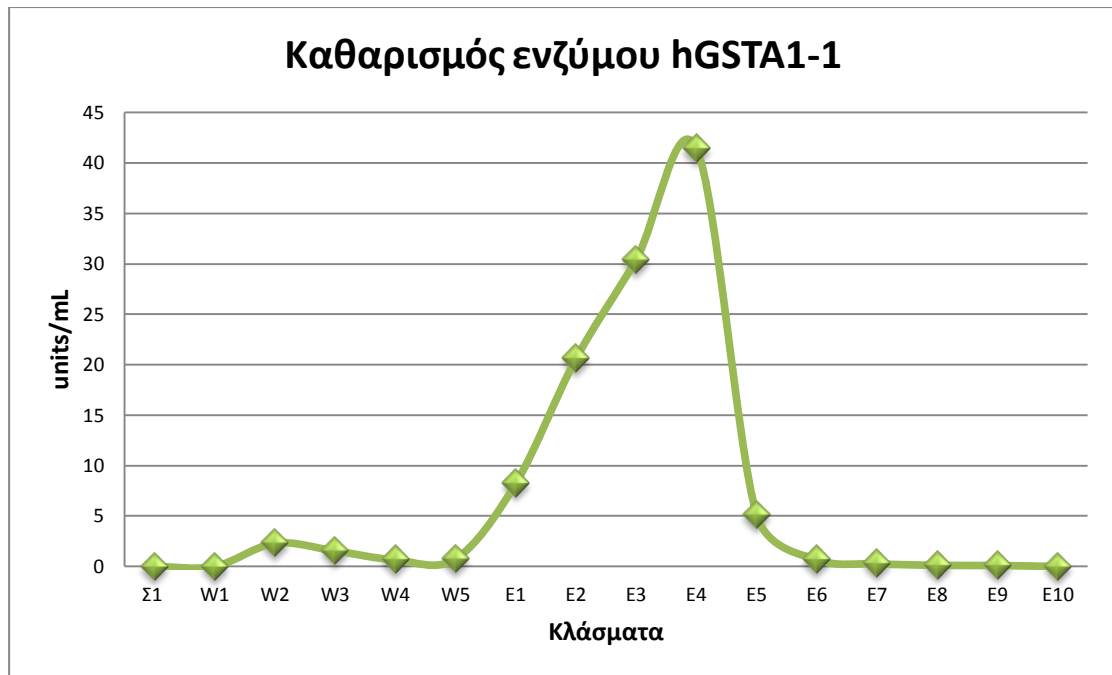
1. Καθαρισμός του ενζύμου hGSTA1-1

Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου hGSTA1-1 με χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη Μέθοδο 3.5.

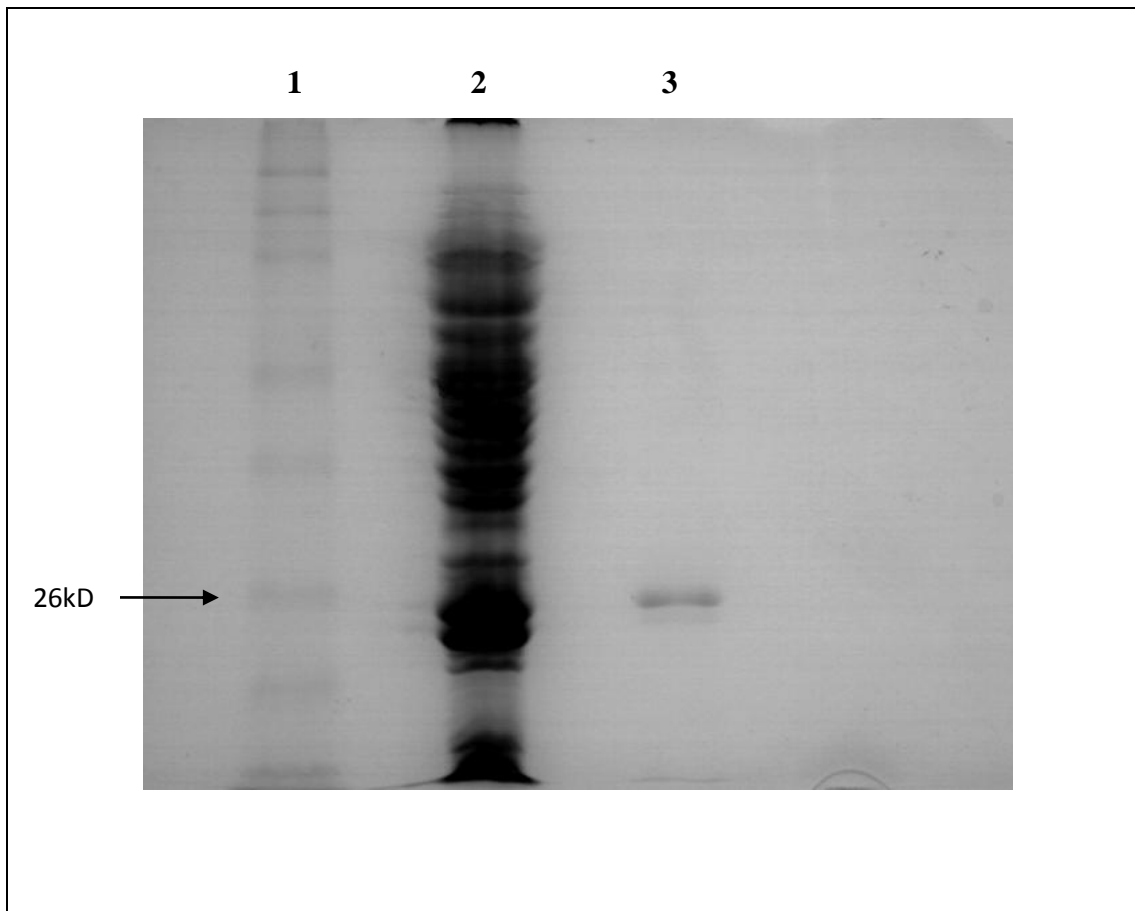
Μετά την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* και τη συλλογή τους ακολούθησε λύση με επίδραση υπερήχων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος. Έγινε δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας το φωτομετρικό προσδιορισμό του ενζύμου (Μέθοδος 4.1), και μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Μέθοδος 5).

Το ενζυμικό εκχύλισμα φορτώνεται στη χρωματογραφική στήλη που περιέχει 3mL προσροφητή. Συνολικά φορτώθηκαν 2,5 mL ενζυμικού εκχυλίσματος. Οι αρχικές μονάδες ενζύμου που φορτώθηκαν στη στήλη ήταν 25 units/mL. Συλλέγονται κλάσματα του 1mL (εκλούσεις E1-E10) και γίνεται έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας και προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης. Οι μονάδες που συλλέχθηκαν από τις εκλούσεις (E1-E10) ήταν συνολικά στα 24,27units/mL και το ποσό της καθαρής πρωτεΐνης 0,718mg/mL. Η απόδοση του καθαρισμού είναι αξιοσημείωτα υψηλή (>95%). Χρωματογράφημα του καθαρισμού εμφανίζεται αναλυτικά στην **Εικόνα 15**.

Στη συνέχεια, η καθαρότητα του ενζύμου εκτιμήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5%w/v πολυακρυλαμίδιο) κάτω από συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο κατά Laemmli (1970) (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα καθαρισμού του ενζύμου hGSTA1-1 με χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B. **Σ1:** βιομόρια που δεν δεσμεύονται στη στήλη συγγένειας και απομακρύνονται, **W1-5:** βιομόρια που δεν δεσμεύονται στη στήλη συγγένειας και απομακρύνονται με ρυθμιστικό διάλυμα, **E1-E10:** έκλυση ενζύμου

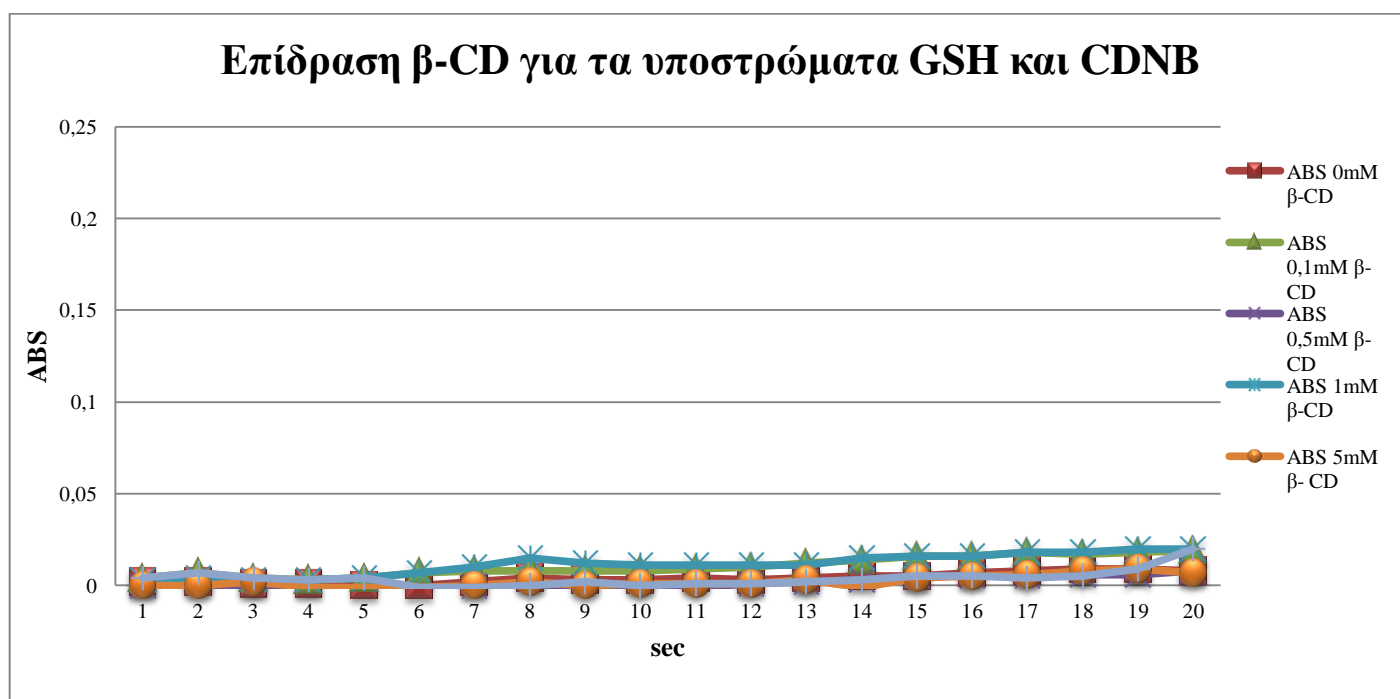


Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (12,5% πολυακρυλαμίδιο) παρουσία SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250. **Θέση 1:** ηλεκτρονικό αποτύπωμα του μάρτυρα. **Θέση 2:** ηλεκτρονικό αποτύπωμα ακατέργαστου εκχυλίσματος μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο hGSTA1-1. **Θέση 3:** ηλεκτρονικό αποτύπωμα του καθαρού ενζύμου hGSTA1-1 που παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία συγγένειας με προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-GSH-Sepharose-CL6B.

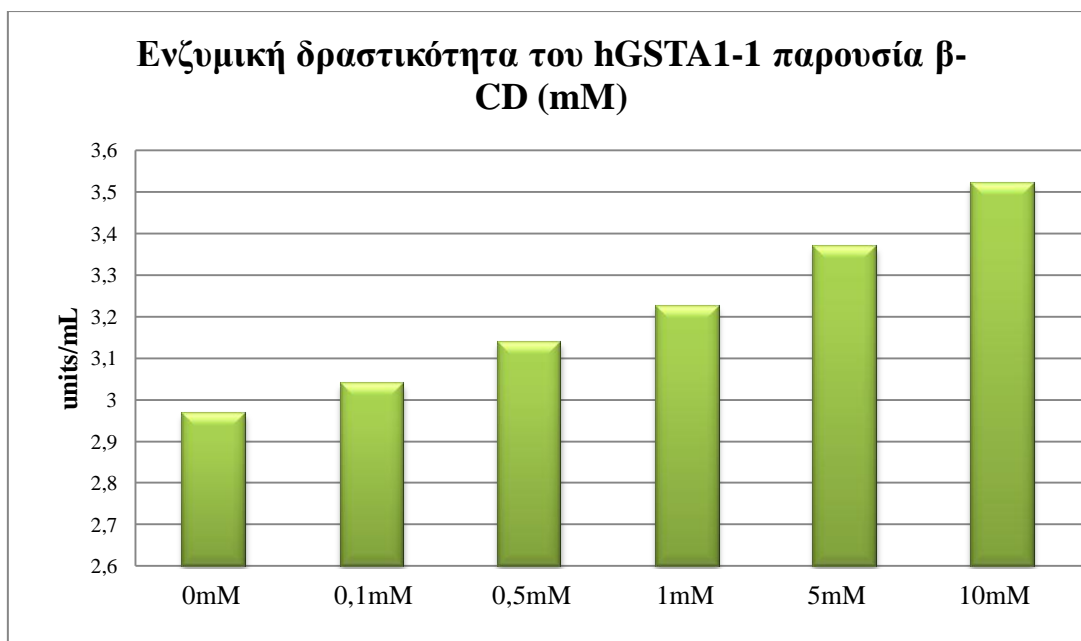
2. Επίδραση κυκλοδεξτρίνης και ενζυμικός προσδιορισμός της hGSTA1-1 παρουσία β-CD

Αρχικά εξετάστηκε η πιθανή επίδραση της β-κυκλοδεξτρίνης προς τα υποστρώματα CDNB και GSH που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου hGSTA1-1. Οι συγκεντρώσεις της β-CD που επιλέχθηκαν αρχικά ήταν 0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM και 10mM. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά στην **Εικόνα 17**.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-CD (0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM, 10mM). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 17 και 18**.



Εικόνα 17: Επίδραση της β-CD διαφορετικών συγκεντρώσεων στα υποστρώματα CDNB και GSH απουσία hGSTA1-1. Οι συγκεντρώσεις της β-CD που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM και 10mM.



Εικόνα 18: Ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοδεξτρίνης. Οι συγκεντρώσεις της β-CD που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM και 10mM.

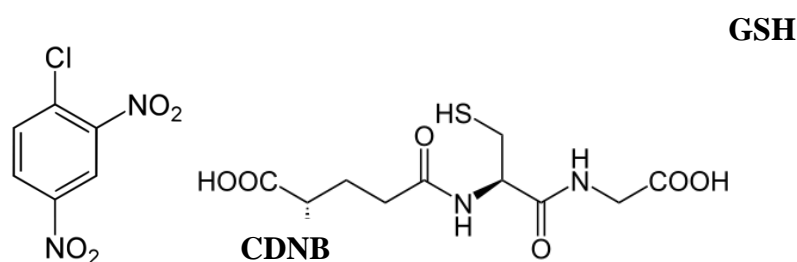
Από την **Εικόνα 17** φαίνεται ξεκάθαρα ότι η β-CD δεν επηρεάζει σημαντικά τη μη ενζυμική αντίδραση επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενζυμική αντίδραση παρουσία hGSTA1-1 και να μελετηθεί η επίδραση που εμφανίζει σε αυτό μέσω του φωτομετρικού προσδιορισμού της μεταφοράς της γλουταθειόνης. Επίσης στην **Εικόνα 18** φαίνεται ότι η συμπλοκοποίηση του ενζύμου hGSTA1-1 με τη β-CD εμφανίζει θετική επίδραση στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-CD προκαλείται αύξηση της δραστηριότητας της hGSTA1-1.

Στη συνέχεια έγινε επιλογή των συγκεντρώσεων 5mM και 10mM κυκλοδεξτρίνης για περαιτέρω μελέτη του συμπλόκου. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν διότι παρουσία των συγκεκριμένων η ενζυμική δραστηριότητα της hGSTA1-1 εμφανίζει σημαντική αύξηση, με τις ενζυμικές μονάδες να φτάνουν στα 22,3% και 27,9% αντίστοιχα. Παρουσία όμως των συγκεντρώσεων 0,1mM, 0,5mM και 1mM β-CD παρατηρείται μια μικρότερη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας στα 9,9%, 13,6% και 17% αντίστοιχα. Ως μάρτυρας θεωρείται η συγκέντρωση 0mM β-CD.

3. Κινητική ανάλυση του ενζύμου hGSTA1-1

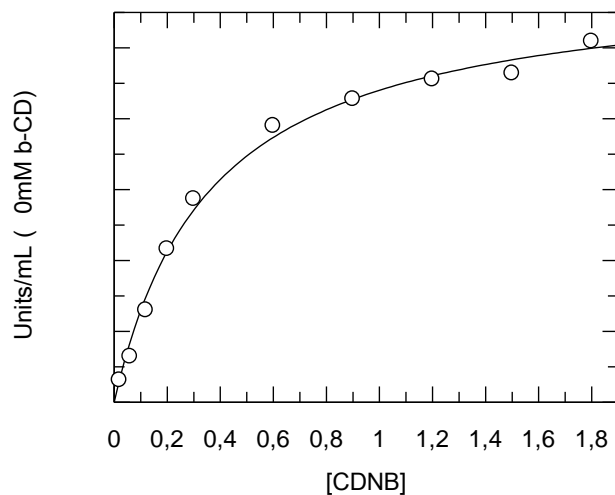
Η ενζυμική κινητική μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η μελέτη της κινητικής μιας ενζυμικής αντίδρασης δίνει πολλά συμπεράσματα για το μηχανισμό της αντίδρασης, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται επίσης βασικές κινητικές σταθερές και από αυτές γίνεται η εκτίμηση για την ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, τη φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και για τους *in vivo* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων (Κλώνης, 1997).

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη ως προς τα υποστρώματα GSH και CDNB (Εικόνα 19). Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι 0,1M KH_2PO_4 pH 6,5 παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β -CD (0mM, 5mM, 10mM) σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση των υποστρωμάτων CDNB και GSH. Το εύρος των συγκεντρώσεων για το υπόστρωμα CDNB είναι 0,02mM-1,8mM και για το υπόστρωμα GSH 0,002mM-6,75mM. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος Graffit 3. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες, όπου φαίνεται η εξάρτηση της ενζυμικής ταχύτητας από τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων (Εικόνα 19-23).

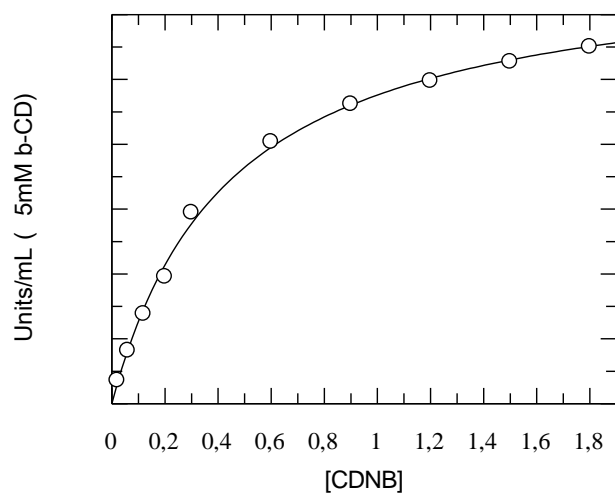


Εικόνα 19: Δομές των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κινητική μελέτη του ενζύμου hGSTA1-1. CDNB: 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο, GSH: γλουταθειόνη.

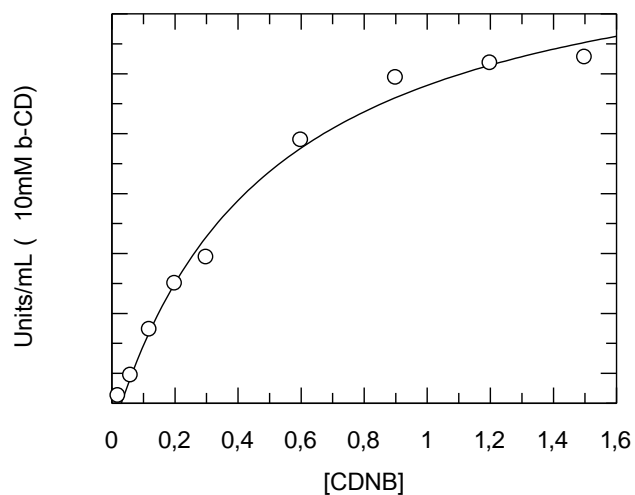
- **Μεταβαλλόμενο υπόστρωμα CDNB**



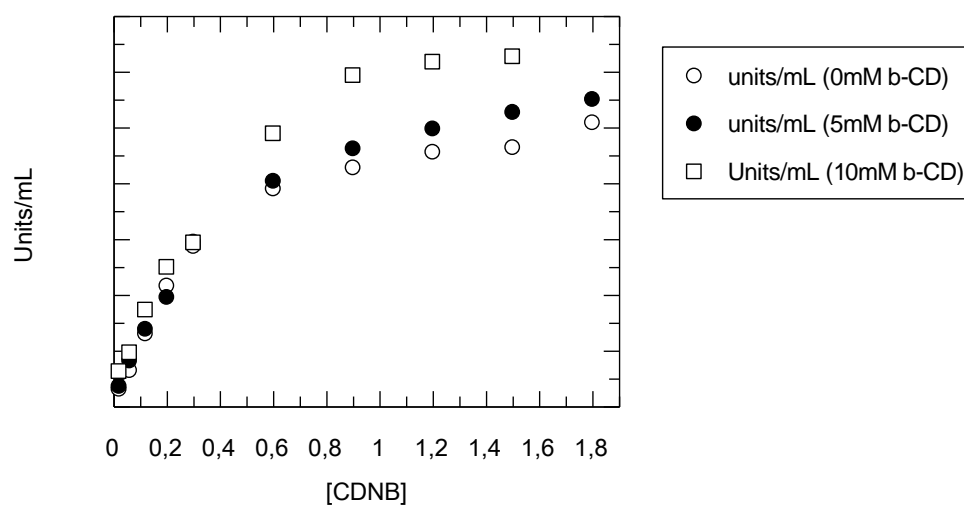
Εικόνα 20: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,02mM-1,8mM), απουσία β-CD (0mMβ-CD).



Εικόνα 21: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,02mM-1,8mM), παρουσία β-CD συγκέντρωσης 5mM.



Εικόνα 22: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,02mM-1,8mM), παρουσία β-CD συγκέντρωσης 10mM.



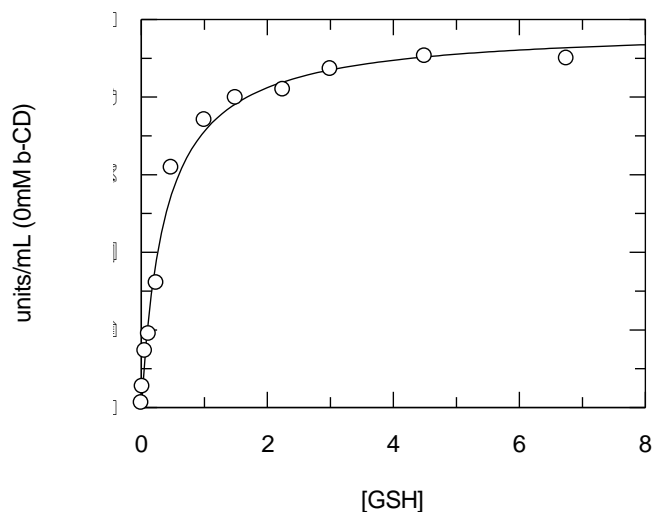
Εικόνα 23: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που παρουσιάζει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα το CDNB (0,02mM-1,8mM), παρουσία β-CD συγκεντρώσεων 0mM, 5mM και 10mM.

Πίνακας 1: Κινητικές σταθερές του ενζύμου hGSTA1-1 για το υπόστρωμα CDNB.

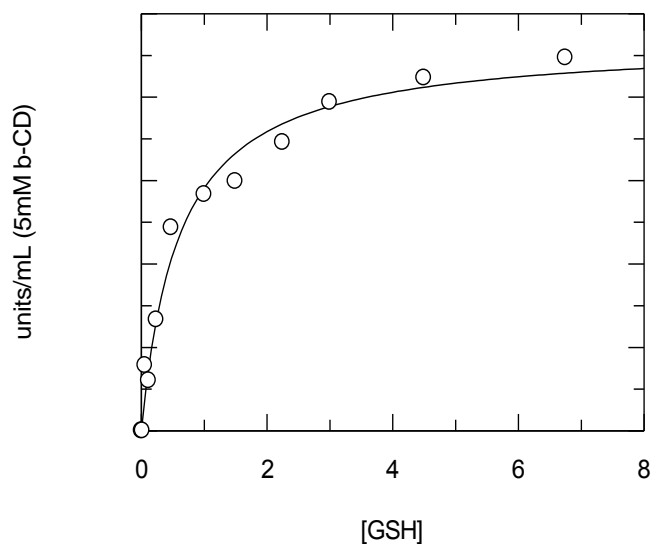
	0mM β-CD	5mM β-CD	10mM β-CD
K_m	0,36 (±0,03)	0,44 (±0,02)	0,49 (±0,05)
V_{max}	12,01	13,72	17,32

Από τον **Πίνακα 1** παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγγένεια με το υπόστρωμα CDNB εμφανίζεται στο ελεύθερο ένζυμο (0mM β-CD) με τη χαμηλότερη K_m (0,3540) ενώ η χαμηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα CDNB παρατηρείται παρουσία 10mM β-CD (k_m 0,4915). Επίσης, παρουσία των 5mM β-CD η συγγένεια ως προς το υπόστρωμα CDNB παρατηρείται κάπου στο ενδιάμεσο των άλλων συγκεντρώσεων με K_m 0,4411. Έτσι λοιπόν, η παρουσία της β-CD επηρεάζει αρνητικά τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα CDNB, αυξάνοντας την K_m κατά 21% και 35% παρουσία συγκεντρώσεων 5mM και 10mM β-CD αντίστοιχα.

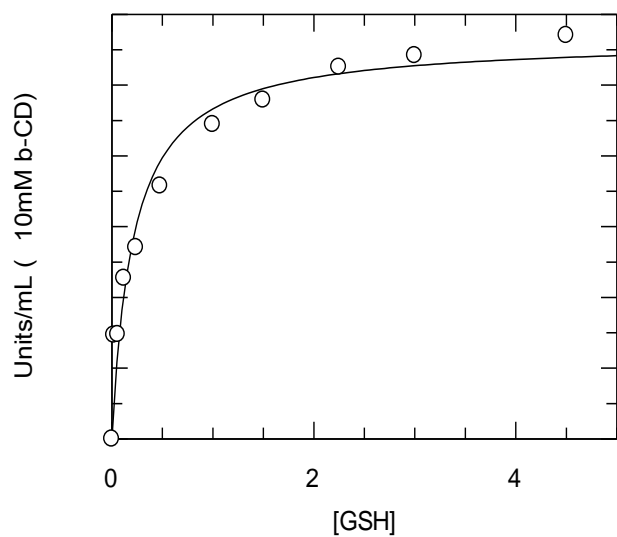
- **Μεταβαλλόμενο υπόστρωμα GSH**



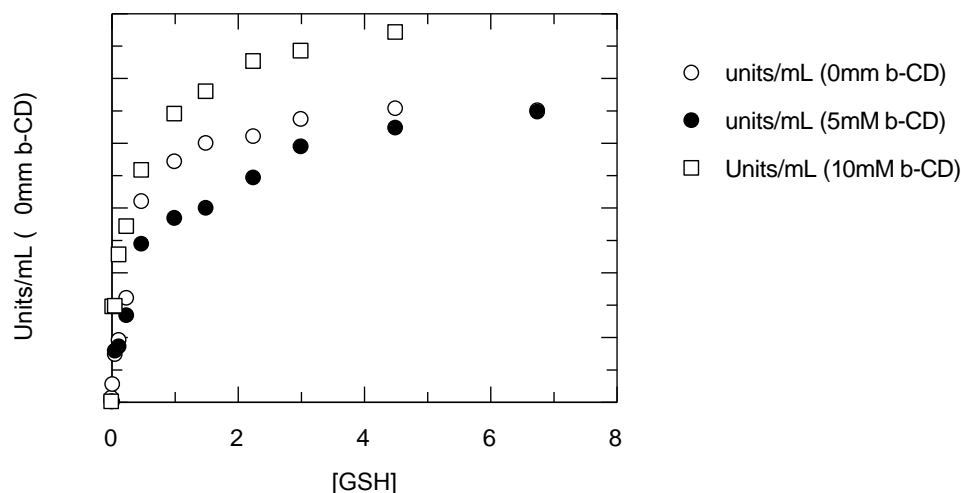
Εικόνα 24: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,002mM-6,75mM) απουσία β-CD (0mM β-CD).



Εικόνα 25: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,002mM-6,75mM) παρουσία β-CD συγκέντρωσης 5mM.



Εικόνα 26: Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,002mM-6,75mM) παρουσία β-CD συγκέντρωσης 10mM.



Εικόνα 27: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που παρουσιάζει την εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1 χρησιμοποιώντας ως μεταβαλλόμενο υπόστρωμα τη GSH (0,002mM-6,75mM), παρουσία β-CD συγκεντρώσεων 0mM, 5mM και 10mM.

Πίνακας 2: Κινητικές σταθερές του ενζύμου hGSTA1-1 για το υπόστρωμα GSH.

	0mM β-CD	5mM β-CD	10mM β-CD
K_m	0,38(±0,04)	0,21(±0,04)	0,57(±0,08)
V_{max}	9,78	9,24	11, 29

Από τον **Πίνακα 2** παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγγένεια με το υπόστρωμα GSH εμφανίζεται παρουσία των 5mM β-CD με τη χαμηλότερη K_m (0,2101) ενώ η χαμηλότερη συγγένεια με το υπόστρωμα παρατηρείται παρουσία των 10mM β-CD (0,3757). Επίσης, απουσία β-CD (0mM β-CD) η συγγένεια ως προς το υπόστρωμα παρατηρείται κάπου στο ενδιάμεσο με K_m 0,3757. Έτσι λοιπόν, η παρουσία της β-CD επηρεάζει κατά λιγότερο τρόπο τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα GSH. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία των 5mM της β-CD η K_m μειώνεται κατά 55,9% αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια του ενζύμου για τη GSH, ενώ παρουσία των 10mM της β-CD η τιμή της K_m αυξάνεται κατά 51% μειώνοντας κατά πολύ τη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα GSH.

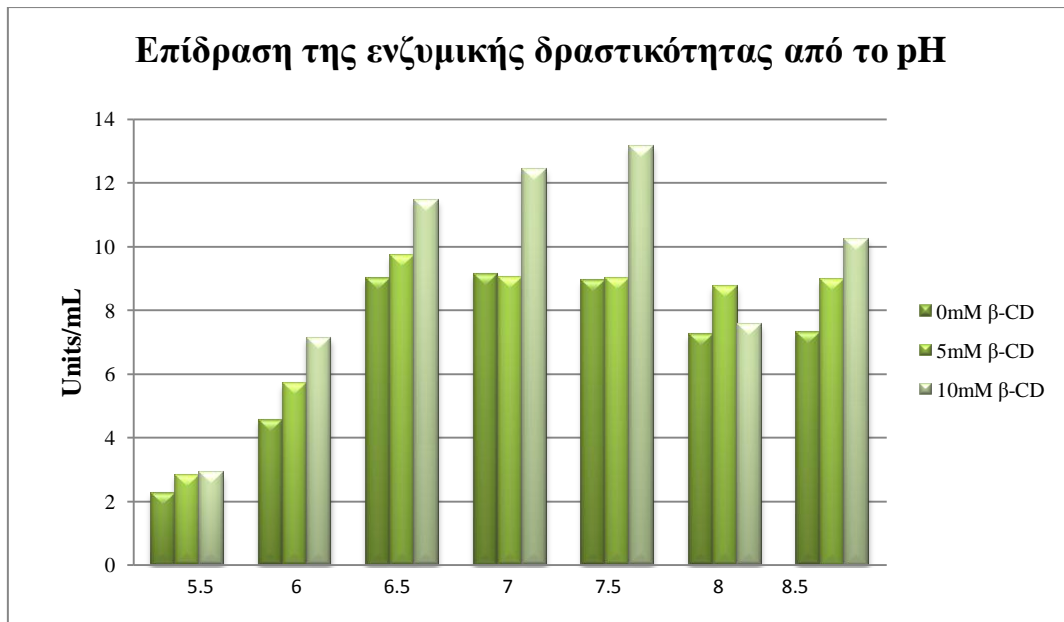
4. Επίδραση pH στην ταχύτητα της αντίδρασης του ενζύμου hGSTA1-1

Το pH αποτελεί έναν παράγοντα που συνήθως επηρεάζει σημαντικά τη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Τα ένζυμα αποτελούνται από ιονιζόμενες ομάδες με διαφορετική σημασία και λειτουργία, επομένως το pH είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα εξής:

- Τη χημική κατάσταση (βαθμό ιονισμού) αμινοξικών καταλοίπων της ενεργής περιοχής.
- Τη χημική κατάσταση αμινοξικών καταλοίπων που επηρεάζουν τη δέσμευση του υποστρώματος και άλλων μορίων στο ένζυμο.
- Τη χημική κατάσταση αμινοξικών καταλοίπων που επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του ενζυμικού μορίου συνολικά.
- Τη χημική κατάσταση των υποστρωμάτων.

Κάθε ένζυμο έχει το δικό του άριστο ή βέλτιστο pH στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης στις συγκεκριμένες συνθήκες.

Η εξάρτηση της ταχύτητας από το pH πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH_2PO_4 . Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β -CD (0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM, 10mM) διατηρώντας όλες τις άλλες συνθήκες σταθερές (συγκέντρωση υποστρώματος, ποσότητα ενζύμου) και μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος προκειμένου να προσδιοριστεί η εξάρτηση της ταχύτητας από το pH. Το εύρος pH που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 5,5-8,5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 28**.



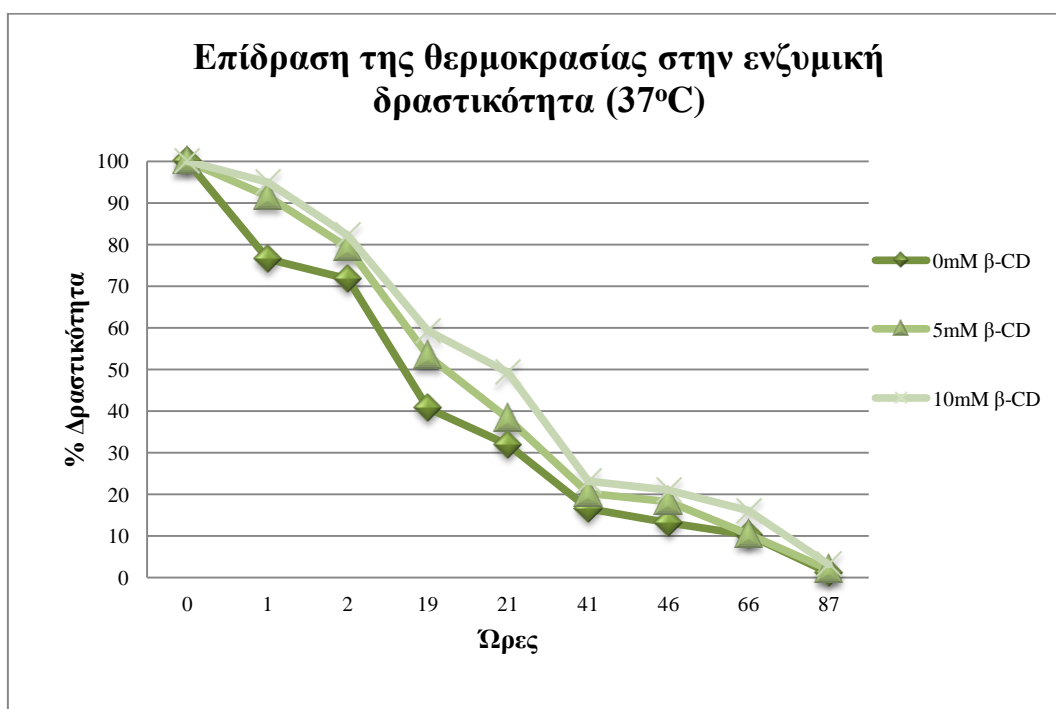
Εικόνα 28: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της εξάρτησης της ενζυμικής δραστηριότητας από το pH, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοδεξτρίνης.

Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι η παρουσία της β-CD προκαλεί χαρακτηριστική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας στο εύρος των pH που χρησιμοποιήθηκαν, με μεγαλύτερη να εμφανίζεται παρουσία των 10mM β-CD. Επίσης η παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης προκαλεί μετατόπιση του βέλτιστου pH προς την αλκαλική περιοχή. Για παράδειγμα, παρουσία 10mM β-CD το βέλτιστο pH της ενζυμικής αντίδρασης βρίσκεται στην περιοχή του 7,5 ενώ απουσία κυκλοδεξτρίνης (0mM β-CD) το βέλτιστο pH είναι μεταξύ της περιοχής 6,5-7,5.

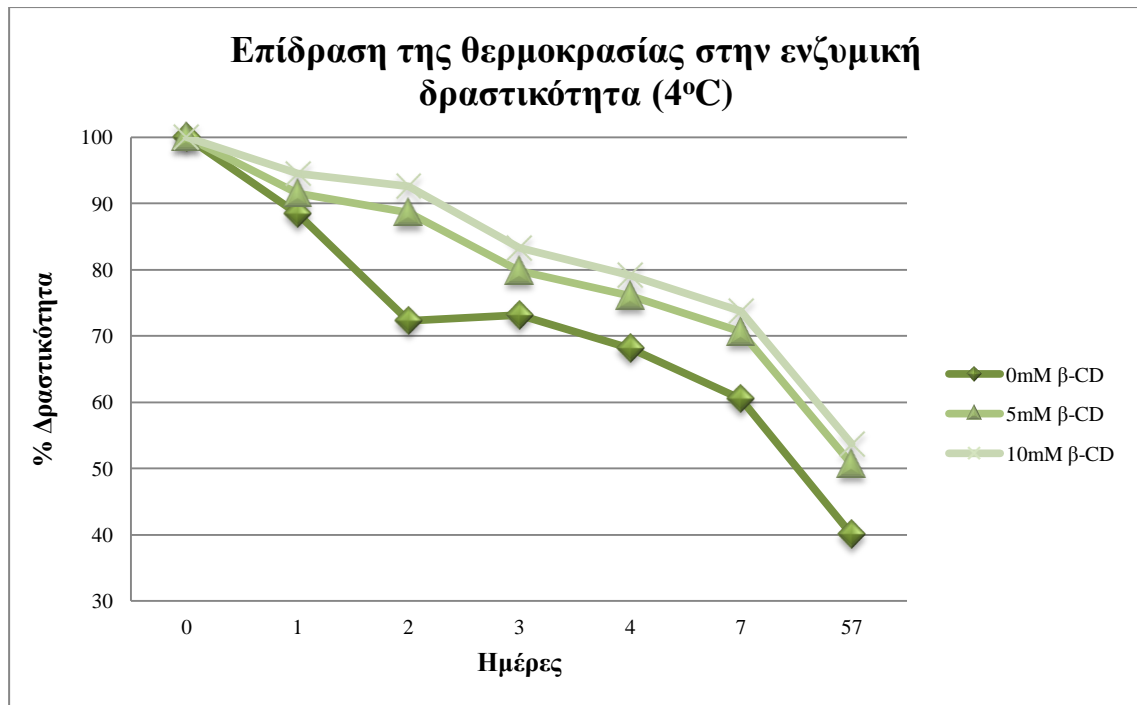
5. Σύγκριση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου hGSTA1-1

Όπως είναι γνωστό, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξήσουν τη σταθερότητα μορίων όπως τα ένζυμα όταν αυτά βρίσκονται σε ακραίες συνθήκες.

Μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM). Το εύρος θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε είναι 4-37°C. Η ολοκλήρωση του πειράματος πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση 72 ωρών στους 37°C και 57 μερών στους 4°C. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH_2PO_4 pH 6,5 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-CD (0mM, 5mM, 10mM). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου hGSTA1-1.



Εικόνα 29: Μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου hGSTA1-1 στους 37°C σε συνάρτηση με το χρόνο. Η επώαση κράτησε 87 ώρες.



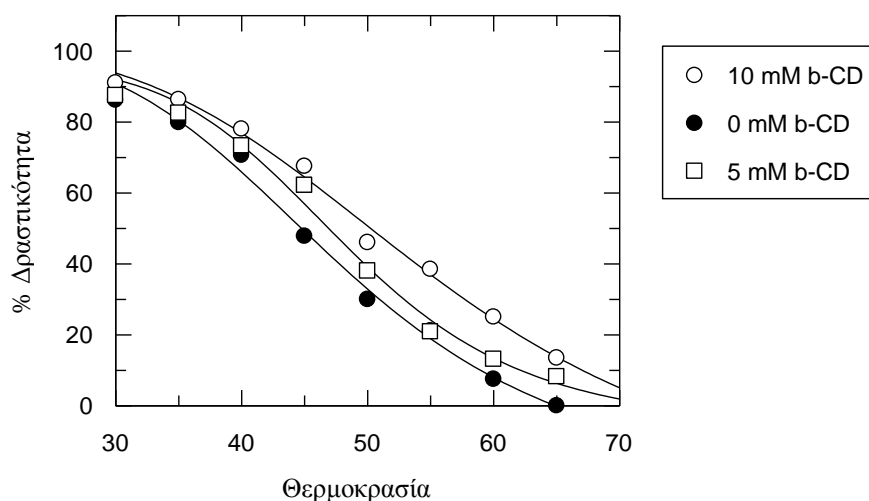
Εικόνα 30: Μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου hGSTA1-1 στους 4°C σε συνάρτηση με το χρόνο. Η επώαση κράτησε 57 ημέρες.

Από παραπάνω εικόνες προκύπτει ξεκάθαρα ότι παρουσία β-CD το ένζυμο παρουσιάζει υψηλότερη σταθερότητα συγκριτικά με το μάρτυρα (0mM β-CD). Η σταθερότητα του ενζύμου αυξάνεται κ παρουσία κυκλοδεξτρίνης σε συγκεντρώσεις 5mM και 10mM. Η β-κυκλοδεξτρίνη λοιπόν, παρέχει ‘προστασία’ στο ένζυμο hGSTA1-1 υπό συνθήκες υψηλής (37°C) και χαμηλής (4 °C) θερμοκρασίας.

6. Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m) του ενζύμου hGSTA1-1

Οι προηγούμενες αναλύσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα για τη θετική επίδραση της κυκλοδεξτρίνης στη σταθερότητα του ενζύμου. Για κάθε συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης που επιλέχθηκε (0mM, 5mM, 10mM) προσδιορίστηκε η T_m . Η T_m είναι εκείνη η θερμοκρασία στην οποία η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου περιορίζεται στο μισό (50%). Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να μας βοηθήσουν να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο επίδρασης της κυκλοδεξτρίνης στη σταθερότητα του ενζύμου.

Για τον προσδιορισμό της ζητούμενης θερμοκρασίας, επιλέχθηκε το θερμοκρασιακό εύρος 25°C-65°C στο οποίο μετά από επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε κάθε θερμοκρασία, μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 31**.



Εικόνα 31: Η γραφική παράσταση προσδιορισμού της θερμοκρασίας τήξεως T_m του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β -CD (0mM, 5mM, 10mM) κατά την αδρανοποίησή του σε διάφορες θερμοκρασίες.

Πίνακας 3: Παρουσίαση των τιμών της T_m του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β -CD.

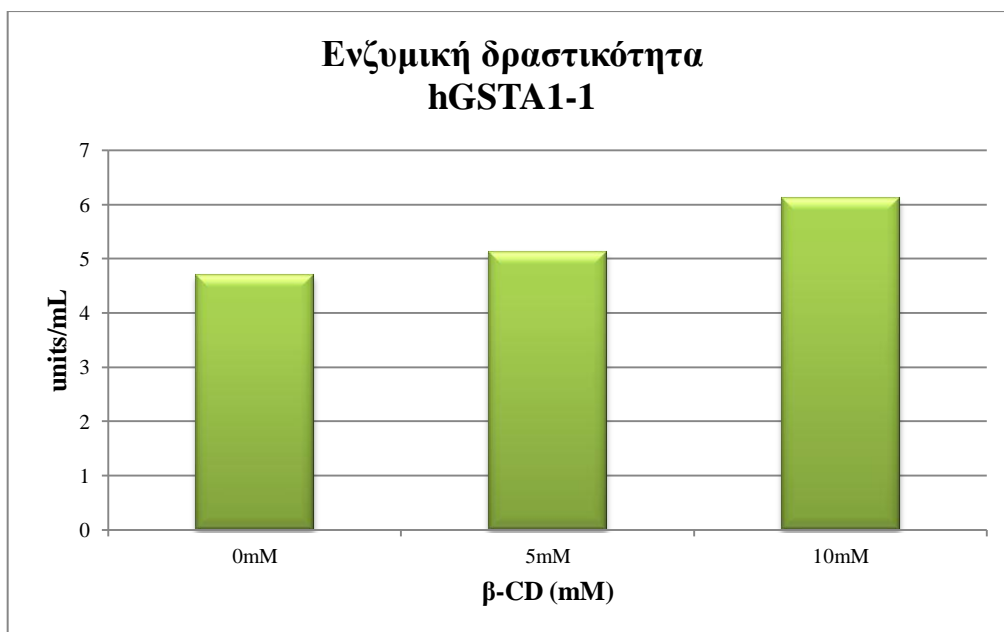
0mM β-CD	5mM β-CD	10mM β-CD
47,7 °C	48,3°C	54,8°C

Παρατηρούμε ότι η προσθήκη της β -CD με στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας του ενζυμικού μορίου, προκαλεί βελτίωση στη θερμοσταθερότητα του μορίου. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων β -κυκλοδεξτρίνης ασκεί θετική επίδραση στη σταθερότητα του ενζύμου κατά την επώαση του σε ακραίες θερμοκρασίες.

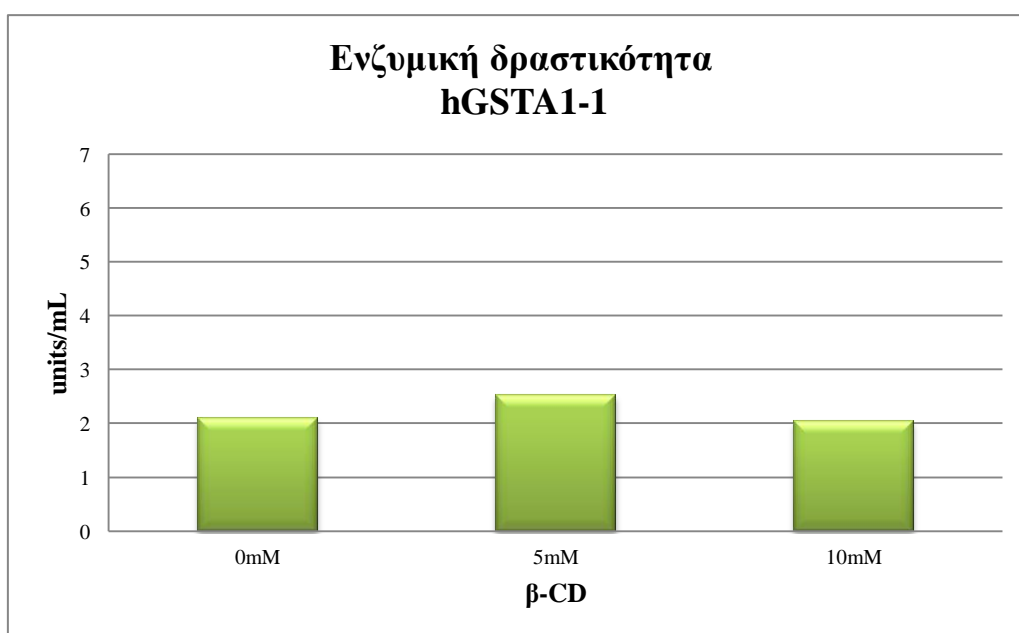
7. Επίδραση της β -CD σε συνθήκες λυοφιλίωσης του hGSTA1-1

Τα ένζυμα όταν δεν είναι σε ένα ιδανικό εύρος θερμοκρασίας υπόκεινται σε μια διαδικασία που ονομάζεται μετουσίωση. Η μετουσίωση παραμορφώνει το φυσικό σχήμα του ενζύμου και το αναγκάζει να είναι μη-λειτουργικό. Μετουσίωση ενός ενζύμου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τοποθέτηση αυτού σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος ή ισχυρού οξέος, όπως επίσης η θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία ή η τοποθέτηση σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. -20°C). Η τρισδιάστατη δομή ενός ενζύμου αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την καταλυτική δραστηριότητα καθώς και για την πραγματοποίηση αντιδράσεων που μετέχουν στην κατάλυση. Μόλις επέλθει η μετουσίωση, η δομή του ενζύμου παραμορφώνεται με αποτέλεσμα το ένζυμο να καθίσταται μη λειτουργικό.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ψύξης του ενζύμου στους -20°C και λυοφιλίωσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 50mM pH 7. Η μέτρηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης έγινε μέσω φωσφομετρικού προσδιορισμού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοδεξτρίνης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 5mM και 10mM β -κυκλοδεξτρίνης (β -CD). Πραγματοποιήθηκε διαπίδυση σύμφωνα με τη μέθοδο 3.3 με σκοπό την απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικών, pH 7. Το καθαρό ένζυμο hGSTA1-1 αραιώθηκε 5 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 50mM pH 7 και τοποθετήθηκε στους -20°C για μισή ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση για την απομάκρυνση του ρυθμιστικού και επαναδιαλυτοποίηση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 50mM pH 7. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις **Εικόνες 32 και 33**.



Εικόνα 32: Παρουσίαση της ενζυμικής δραστηριότητας της hGSTA1-1 μετά τη διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικών, pH 7 παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM).



Εικόνα 33: Παρουσίαση της ενζυμικής δραστηριότητας της hGSTA1-1 μετά από ψύξη στους -20°C για μισή ώρα, λυοφιλίωση αυτού για απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος και επαναδιαλυτοποίηση σε ρυθμιστικό φωσφορικών pH 7 παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM).

Από τις **Εικόνες 32** και **33** παρατηρούμε ότι με τη ψύξη του ενζύμου hGSTA1-1 στους -20°C και λυοφιλίωσης, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται δραστικά. Πιο συγκεκριμένα, απουσία της β -CD η ενζυμική δραστηριότητα μειώθηκε κατά 55,3% ενώ παρουσία των 5mM και 10mM τα επίπεδα μείωσης είναι 50,7% και 66,6% αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στη μετουσίωση που προκλήθηκε στο ένζυμο με την τοποθέτηση αυτού στη ψύξη χωρίς την παρουσία γλυκερόλης.

Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι παρουσία των 10mM β -CD προκαλείται μεγαλύτερη μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα της hGSTA1-1 σε σχέση με εκείνη των 0mM και 5mM. Η συμπεριφορά αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί βασιζόμενοι στις αλληλεπιδράσεις των φορτίων που δημιουργούνται και το πώς αυτές επηρεάζονται από τη θερμοκρασία. Στη φυσική επικρατεί η αρχή ότι με τη μείωση της θερμοκρασίας ενισχύονται οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της β -κυκλοδεξτρίνης περισσότερα ιόντα αλληλεπιδρούν με την πρωτεϊνική επιφάνεια ώστε να επιδρά αρνητικά και να αποδιατάσσει τη δομή του ενζύμου και έτσι να μειώνει τη δραστηριότητα του ακόμα περισσότερο. Αυτός είναι πιθανώς και ο λόγος που στους -20°C η συγκέντρωση των 10mM δεν παρέχει την ίδια προστασία στο ένζυμο εν συγκρίσει παρουσίας μικρότερης συγκέντρωσης όπως εκείνης των 5mM.

8. Θερμοδυναμική μελέτη του ενζύμου hGSTA1-1

Για περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη της επίδρασης της β-κυκλοδεξτρίνης στην ενζυμική δράση, πραγματοποιήθηκε θερμοδυναμική μελέτη του συστήματος ενζύμου-κυκλοδεξτρίνης. Στο συγκεκριμένο πείραμα προσδιορίστηκαν οι μεταβολές των βασικών θερμοδυναμικών μεγεθών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της β-CD (0mM, 5mM, 10mM).

Πειραματικά, οι δύο απλούστερες θερμοδυναμικές προσεγγίσεις περιγράφονται από τους μαθηματικούς τύπους του Eyring και Arrhenius οι οποίοι προκύπτουν κατά βάση από τις θεμελιώδεις αρχές που διέπουν μια χημική αντίδραση. Ειδικότερα ο τύπος του Arrhenius περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Εξίσωση του Arrhenius: $\ln V = -E_a/RT + \ln A$

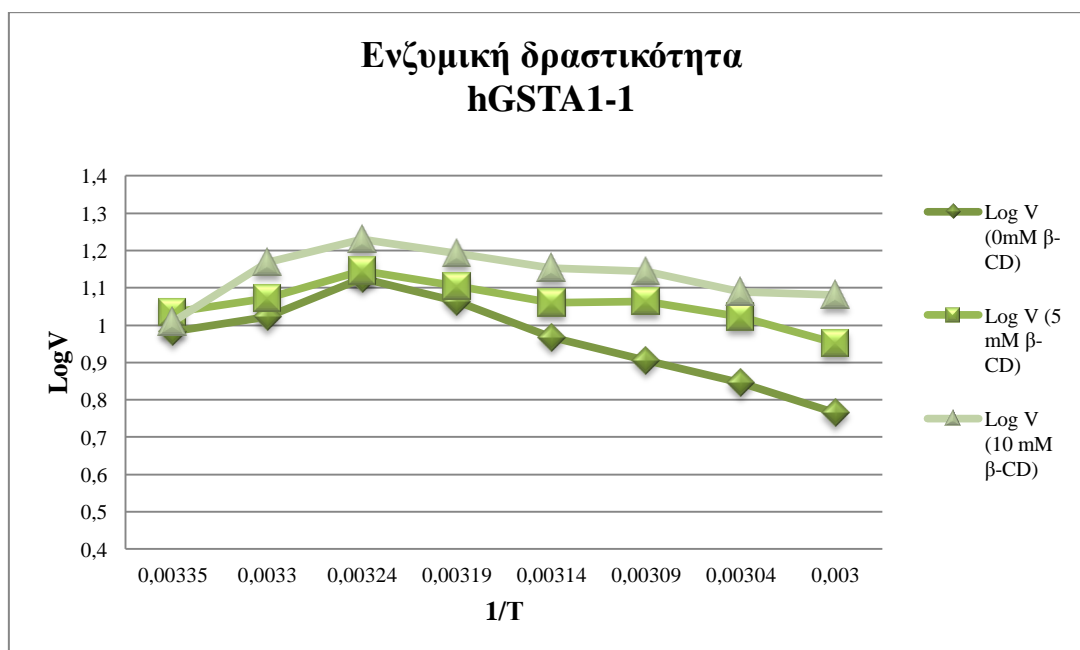
- T: απόλυτη θερμοκρασία σε βαθμούς K
- $\ln A$: μεταβολή της εντροπίας
- E_a : ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης
- V: κινητική σταθερά που προσδιορίζεται πειραματικά για κάθε θερμοκρασία
- R: παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/molK)
- h: σταθερά του Planck ($h=6,626 \times 10^{-34}$ Js)

Εξίσωση του Eyring: $\ln (V/T) = -\Delta H/RT + \ln(k_B/h) + \Delta S/R$

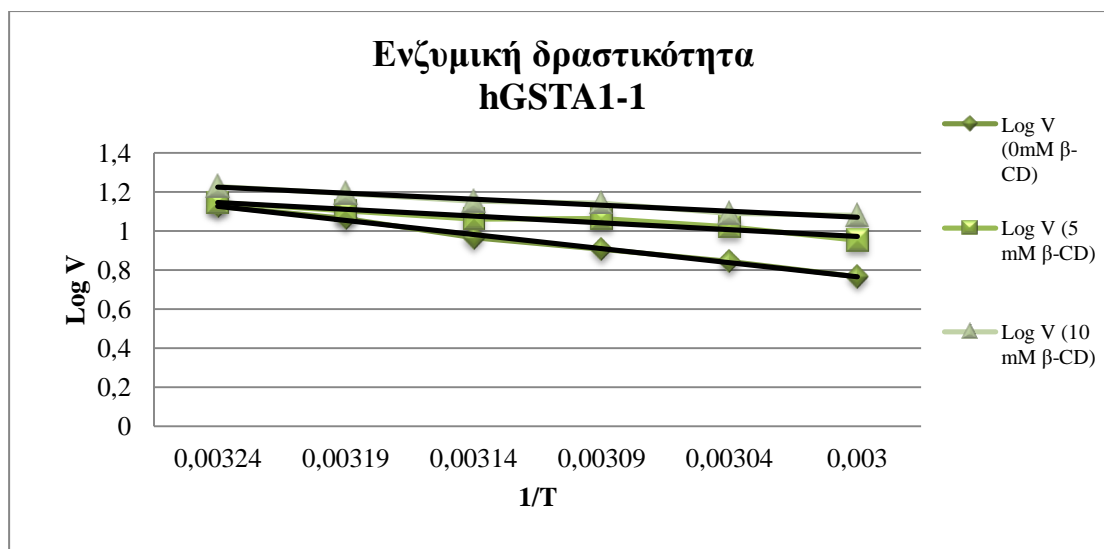
- ΔH : μεταβολή της ενθαλπίας
- ΔS : μεταβολή της εντροπίας
- T: απόλυτη θερμοκρασία σε βαθμούς K
- V: κινητική σταθερά που προσδιορίζεται πειραματικά για κάθε θερμοκρασία
- R: παγκόσμια σταθερά των αερίων
- k_B : σταθερά του Boltzmann
- h: η σταθερά του Planck

Οι τιμές των τριών τελευταίων σταθερών είναι: $k_B=1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$, $h=6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ και $R=8,314 \text{ J/molK}$.

Στη συνέχεια ακολουθεί η **Εικόνα 34-37** από την οποία προσδιορίστηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών (**Πίνακας 4 και 5**).



Εικόνα 34: Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius.



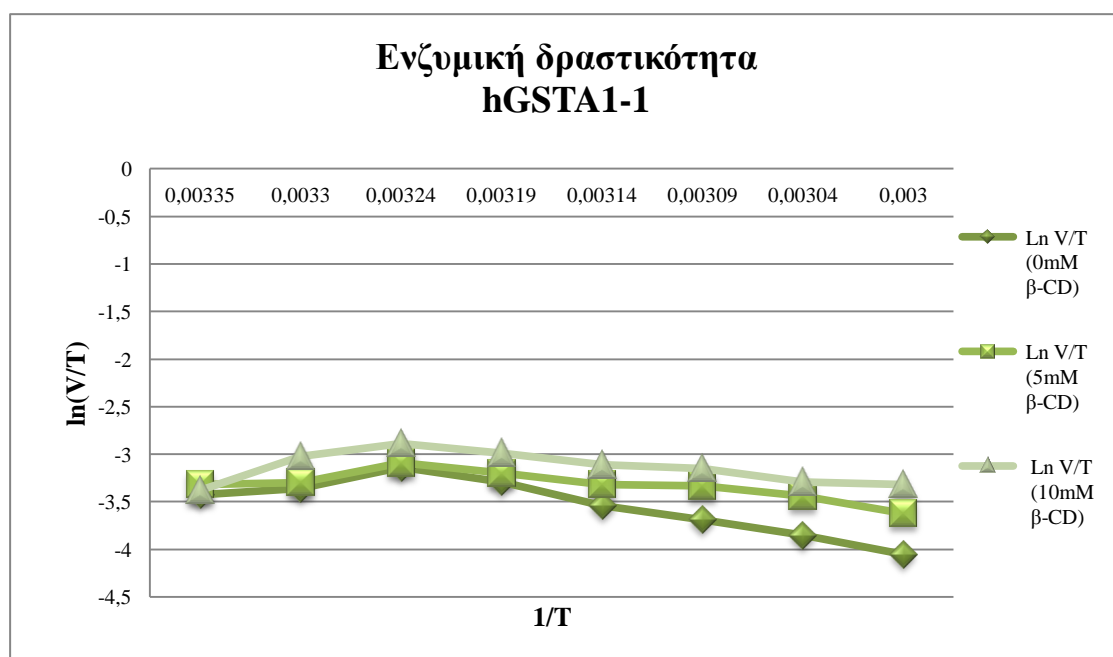
Εικόνα 35: Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius.

Πίνακας 4: Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης E_a πραγματοποιήθηκε για την περιοχή θερμοκρασιών μεταξύ 35-60°C για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius.

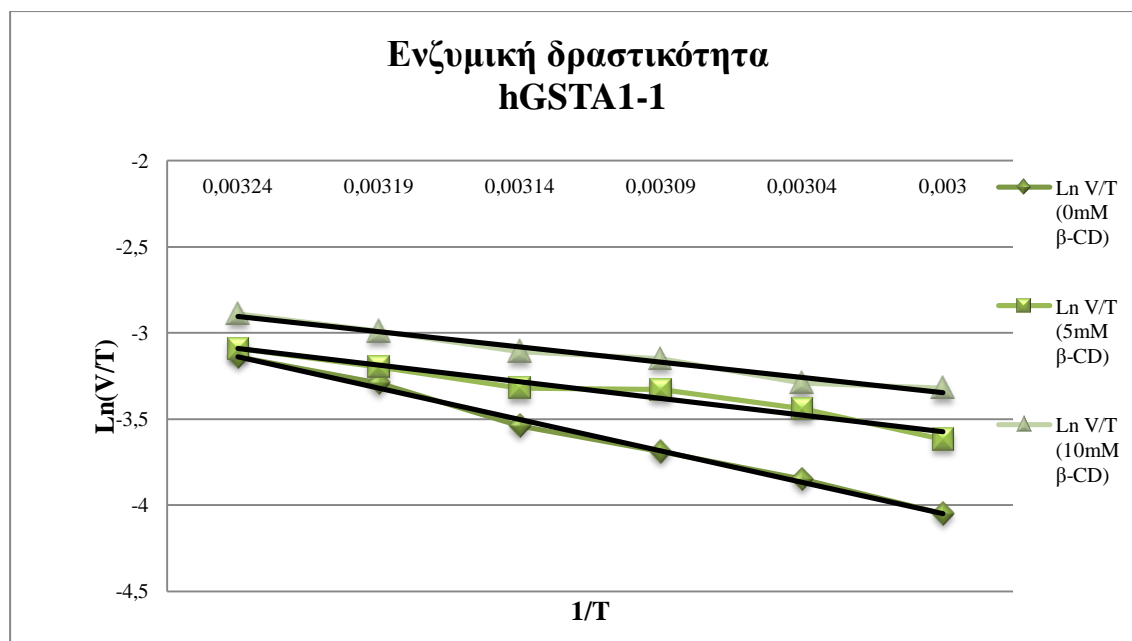
	E_a (J/mol)
0mM	0,599
5mM	0,283
10mM	0,233

Από την **Εικόνα 35** μπορούμε να διακρίνουμε ότι παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης η κλίση της ευθείας μειώνεται. Αντιδράσεις με υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης (μεγάλη κλίση) είναι θερμοκρασιακά ευαίσθητες. Αντιδράσεις με χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης παρουσιάζουν μικρότερη θερμοκρασιακή εξάρτηση. Επομένως, η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης προσδίδει στο ένζυμο θερμοκρασιακή σταθερότητα βελτιώνοντας έτσι την ενζυμική δραστηριότητα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η κλίση

των ευθειών αλλάζει στη θερμοκρασία των 35°C. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι στο ενζυμικό μόριο προκαλείται δομική ανακατάταξη με αποτέλεσμα τη μεταβολή του καθοριστικού σταδίου της αντίδρασης.



Εικόνα 36: Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα με την εξίσωση του Eyring.



Εικόνα 37: Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα με την εξίσωση του Eyring για το εύρος θερμοκρασιών 35-65 οC.

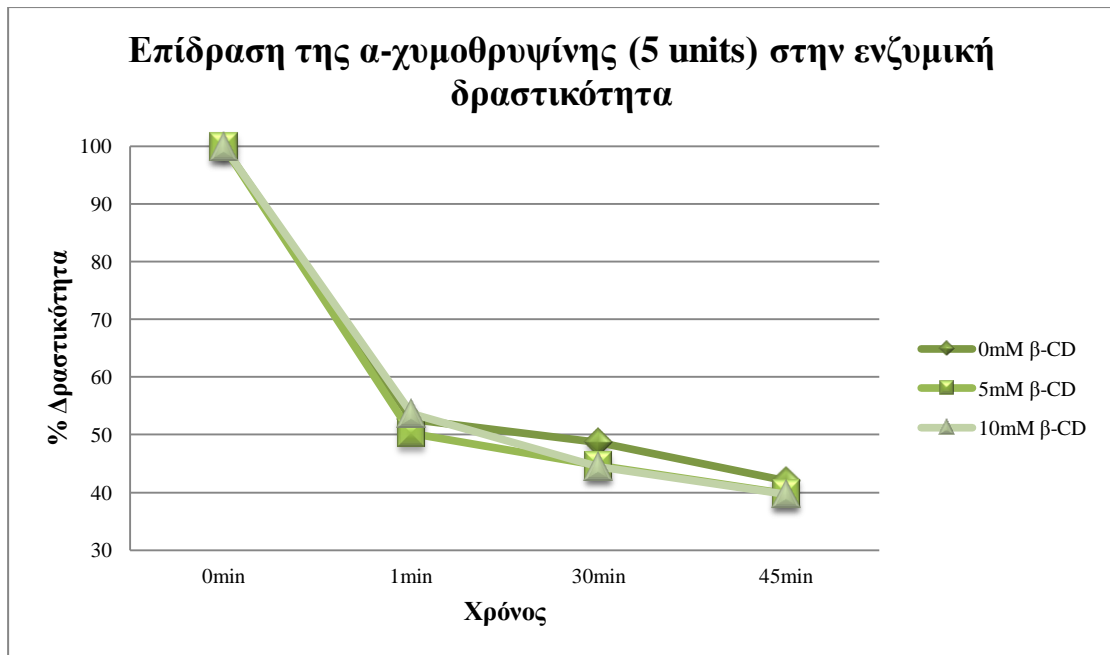
Πίνακας 5: Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για την περιοχή θερμοκρασιών μεταξύ 35-60°C, για το ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης.

	ΔS (KJ/molK)	ΔH (KJ/mol)
0mM	-0,221	0,690
5mM	-0,222	0,803
10mM	-0,222	1,526

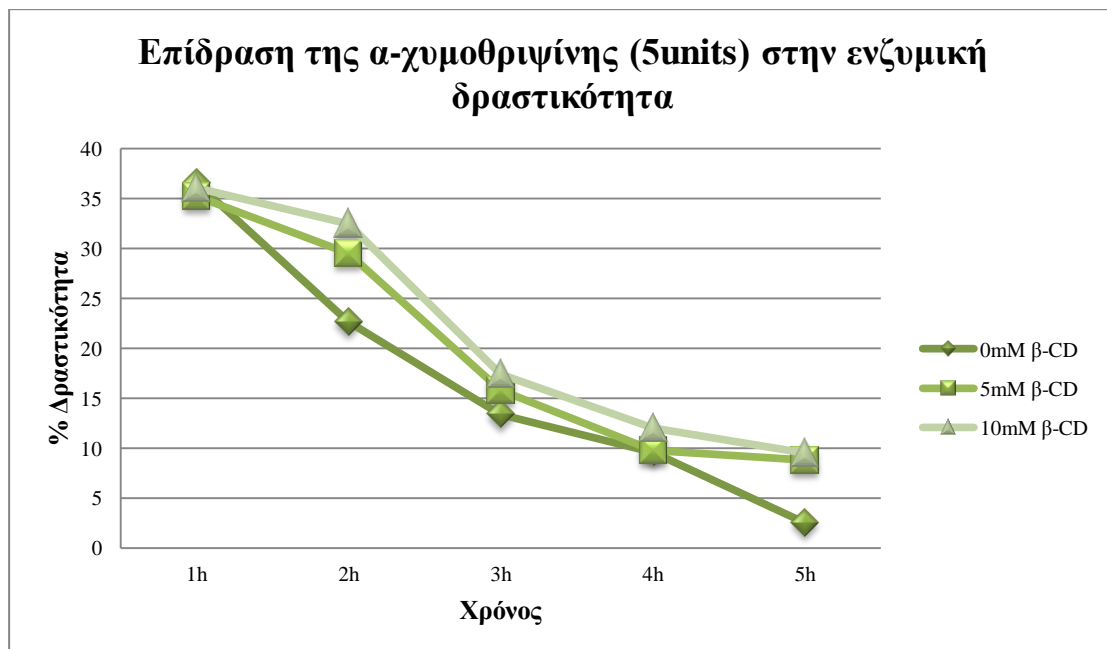
9. Επίδραση της α- χυμοθρυψίνης στο ένζυμο hGSTA1-1

Η χυμοθρυψίνη αποτελεί ένα πεπτικό ένζυμο που υδρολύει πρωτεΐνες. Η σύνθεση της πραγματοποιείται στο πάγκρεας στην ανενεργό της μορφή, το χυμοθρυσογόνο. Ο ρόλος της είναι η διάσπαση πεπτιδίων στις καρβοξυλικές ομάδες της τυροσίνης, της τρυπτοφάνης, και της φαινυλαλανίνης. Αυτά τα αμινοξέα περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο στην πλευρική αλυσίδα τους που ταιριάζει σε μια «υδρόφοβο θύλακα» του ενζύμου. Η χυμοθρυψίνη υδρολύει επίσης άλλους αμιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια με βραδύτερους ρυθμούς, ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν λευκίνη και μεθειονίνη.

Η μελέτη της επίδρασης της α-χυμοθρυψίνης στην ενζυμική δραστηριότητα της hGSTA1-1 πραγματοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 50mM pH 7. Η μέτρηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης έγινε μέσω φωσφομετρικού προσδιορισμού παρουσία και απουσία κυκλοδεξτρίνης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 5mM και 10mM β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD). Η ποσότητα του ενζύμου α-χυμοθρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5units/mL. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις με τα συνθήκες του πειράματος σταθερές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις **Εικόνες 38** και **39**.



Εικόνα 38: Η επίδραση της α-χυμοθρυψίνης (5units) στο ένζυμο hGSTA1-1 στα πρώτα 45λεπτά, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM).



Εικόνα 39: Η επίδραση της α-χυμοθρυψίνης (5units) στο ένζυμο hGSTA1-1 σε εύρος χρόνου 1-5 ώρες, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM).

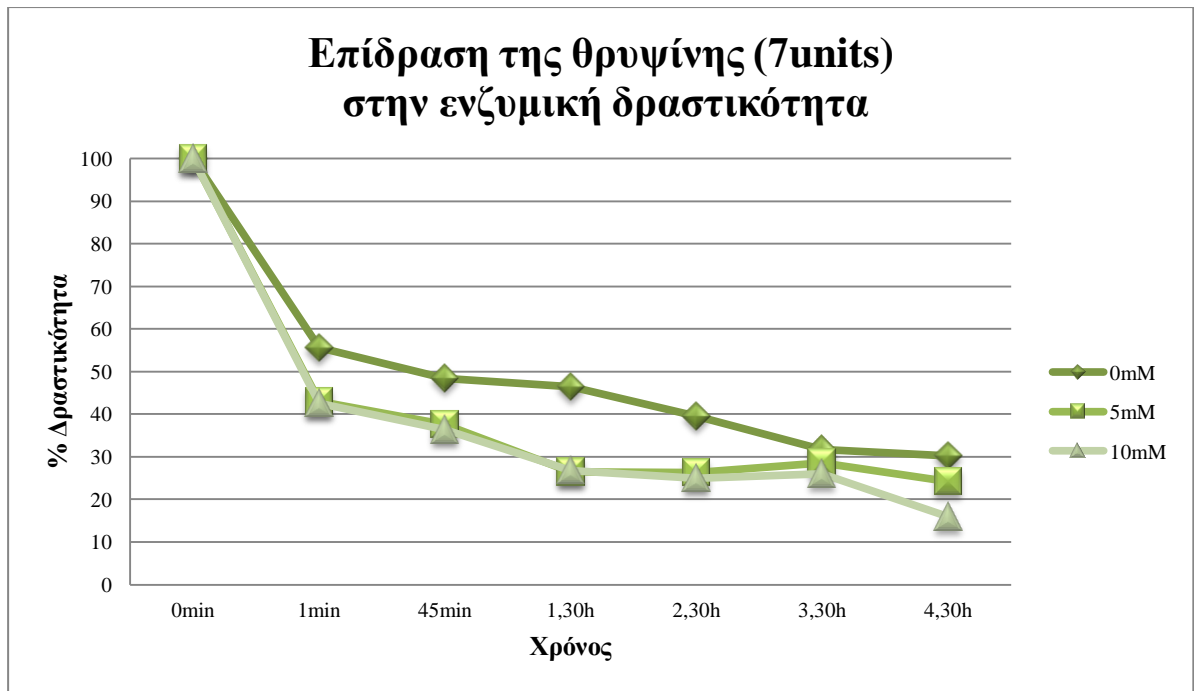
Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης προστατεύει το ένζυμο hGSTA1-1 από την καταλυτική δράση της α-χυμοθρυψίνης. Στην **Εικόνα 36** παρατηρούμε ότι η παρουσία 5units α-χυμοθρυψίνης προκαλεί την κατακόρυφη πτώση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50% περίπου από το 1^ο μόλις λεπτό. Κατά την πάροδο του χρόνου γίνεται πιο εμφανής ο προστατευτικός ρόλος της β-κυκλοδεξτρίνης, ο οποίος είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση αυτής. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης (10mMβ-CD) παρέχει μεγαλύτερη προστασία στο υπό μελέτη ένζυμο με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η ενζυμική του δραστηριότητα.

Στην **Εικόνα 39** γίνεται πλέον σαφές ότι η β-κυκλοδεξτρίνη προστατεύει το ένζυμο hGSTA1-1 από την δράση της α-χυμοθρυψίνης. Όπως αναφέρθηκε, η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης δρα θετικά στη βελτίωση της ενζυμικής δραστηριότητας, ιδιαίτερα παρουσία 10mM β-κυκλοδεξτρίνης συγκριτικά με την παρουσία 5mMκαι 0mMβ-κυκλοδεξτρίνης.

10. Επίδραση της θρυψίνης στο ένζυμο hGSTA1-1

Η θρυψίνη είναι μία πρωτεάση σερίνης που βρίσκεται στο πεπτικό σύστημα και ρόλος της είναι η υδρόλυση πρωτεϊνών. Η παραγωγή της γίνεται στο πάγκρεας όπου συναντάται στην ανενεργό μορφή της, το θυψινογόνο. Διασπά πεπτιδικούς δεσμούς, κυρίως στη θέση του καρβοξυλίου των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, εκτός αν δίπλα από αυτά τα αμινοξέα βρίσκεται η προλίνη. Χρησιμοποιείται για πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες. Η διεργασία συνήθως αναφέρεται ως πρωτεόλυση θρυψίνης ή θρυψινοποίηση, ενώ οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί πέψη ή επεξεργασμένα με θρυψίνη λέγεται να έχουν θρυψινισμό.

Η μελέτη της επίδρασης της θρυψίνης στην καταλυτική δράση του ένζυμου hGSTA1-1 πραγματοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 50mM pH 7. Η μέτρηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης έγινε μέσω φωσφομετρικού προσδιορισμού παρουσία και απουσία κυκλοδεξτρίνης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 5mM και 10mM β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD). Η δραστηριότητα του ενζύμου θρυψίνη είναι 7units/mL. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις με τα συνθήκες του πειράματος σταθερές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 40**.



Εικόνα 40: Η επίδραση της θρυψίνης (7units) στο ένζυμο hGSTA1-1 σε εύρος χρόνου 1- 4,30 ώρες, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης (0mM, 5mM, 10mM).

Η **Εικόνα 40** παρουσιάζει την πορεία της καταλυτικής δράσης της θρυψίνης στο ένζυμο hGSTA1-1. Η παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ενζυμική ταχύτητα της αντίδρασης καθώς και τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η μείωση αυτή φαίνεται να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της β-CD. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία 5mM και 10mM της β-κυκλοδεξτρίνης προκαλεί ταχύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Φαίνεται, λοιπόν, η κυκλοδεξτρίνη να μην έχει προστατευτικό ρόλο στο ένζυμο hGSTA1-1. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η θρυψίνη αναγνωρίζει μη αρωματικά αμινοξέα με αποτέλεσμα να μην προστατεύονται οι αμινοξικοί στόχοι της θρυψίνης.

10. Επίδραση ουρίας στην ενζυμική δραστηριότητα

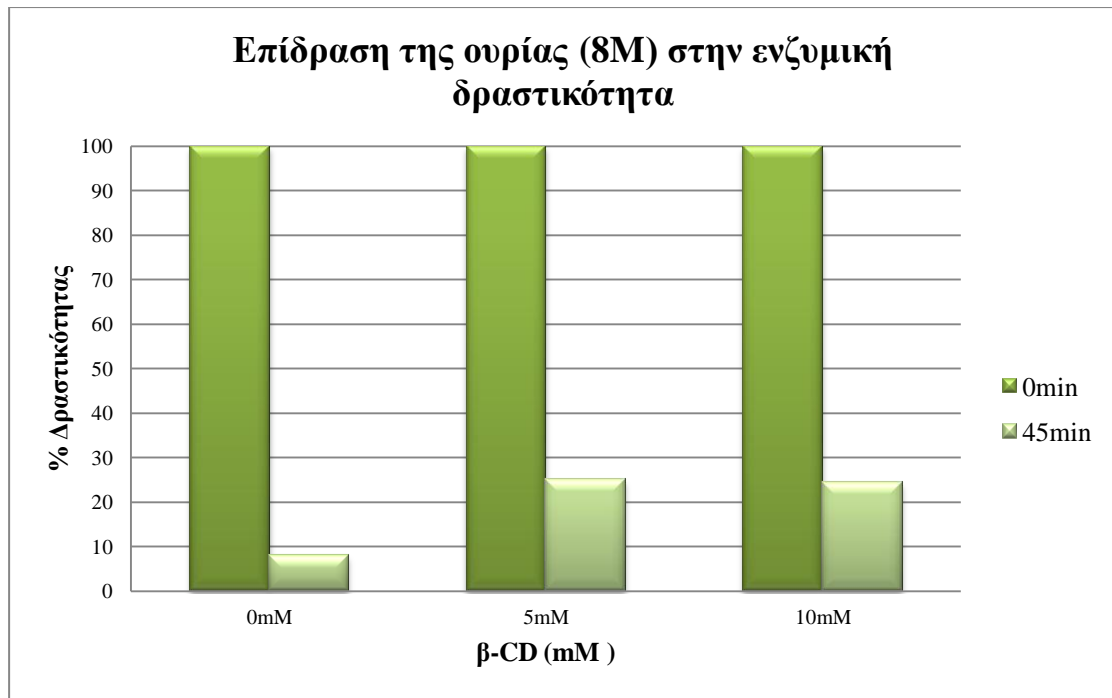
Η ουρία αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αντιδραστήριο μετουσίωσης. Αυτό οφείλεται στην εξαιρετικά πολική δομή της ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$, με ένα διπλό δεσμό μεταξύ C και O). Τα ισχυρά εντοπισμένα φορτία (strong localized charges) της ουρίαςέχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με τα αμινοξικά κατάλοιπα μιας πρωτεΐνης και ενός ενζύμου και να επηρεάσουν αρνητικά τη λειτουργία τους (Canchi et al., 2012).

Η διαδικασία θεωρείται αναστρέψιμη με σταδιακή απομάκρυνση της ουρίας από το υδατικό διάλυμα. Η απομάκρυνση αυτή πραγματοποιείται με αραιώση αυτής. Η πλήρης απομάκρυνση της ουρίας από το διάλυμα προκαλεί ιζήματα των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

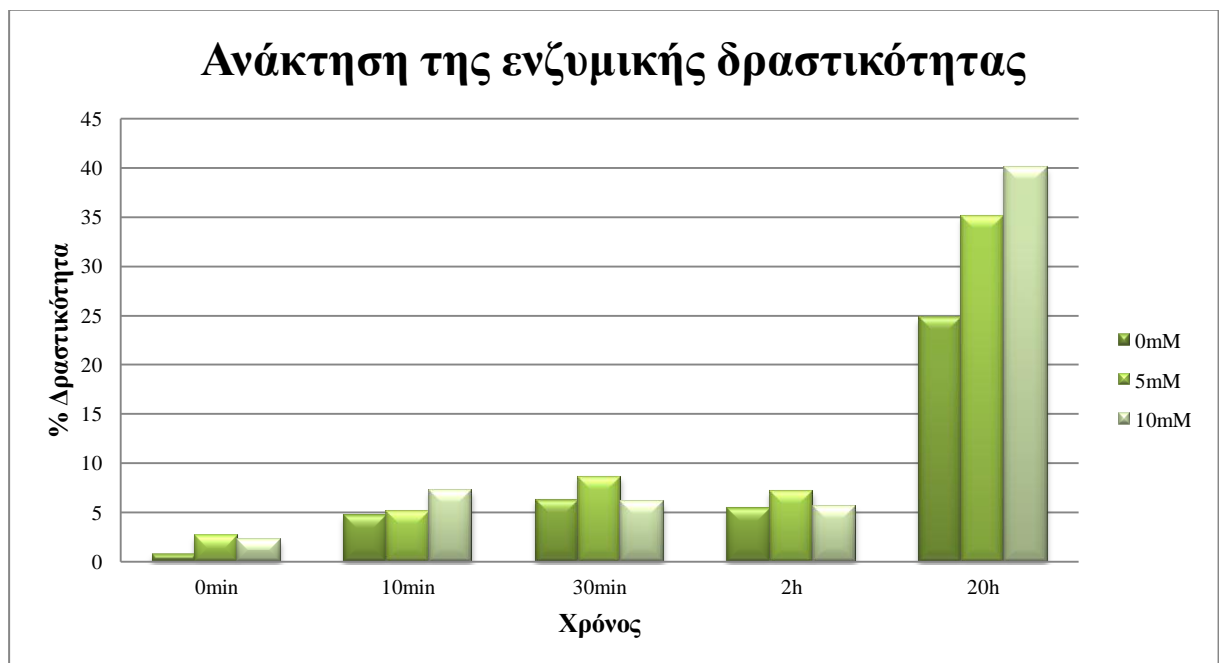
Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας, συγκέντρωσης 8M σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM KH_2PO_4 pH 7, στο ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD). Οι συγκεντρώσεις της β-κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0mM, 5mM, 10mM.

Σε eppendorf του 1,5mL προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ουρίας 8M, ενζύμου hGSTA1-1 και κυκλοδεξτρίνης. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 45min με σκοπό τη μετουσίωση του ενζύμου (**Εικόνα 41**). Στη συνέχεια του πειράματος το υδατικό διάλυμα ουρίας αραιώθηκε κατά 10 φορές ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,8M. Η επώαση του αραιωμένου διαλύματος κράτησε 20h ώστε να ανακτηθεί η ενζυμική δραστηριότητα του hGSTA1-1. Κατά τη διάρκεια της επώασης έγιναν φωτομετρικοί προσδιορισμοί της ενζυμικής ταχύτητας (**Εικόνα 42**).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 41: Επίδραση της ουρίας 8M στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου hGSTA1-1 μετά από επώαση 45min.



Εικόνα 42: Ανάκτηση της ενζυμικής δραστηριότητας του hGSTA1-1 μετά από αραίωση του υδατικού διαλύματος ουρίας 8M κατά 10 φορές, στη διάρκεια του χρόνου.

Η επίδραση της ουρίας σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί τη μετουσίωση των ενζύμων με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση τους. Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας 8M στο ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης. Σε διάρκεια 45min προκλήθηκε σημαντική αναστολή του ενζύμου και της ενζυμικής του δραστηριότητας. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης προσδίδει μια μικρή προστασία στο ένζυμο. Συγκεκριμένα, τα 8M ουρίας προκαλούν αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 92% απουσία β-κυκλοδεξτρίνης ενώ κατά 85% και 86% παρουσία 5mM και 10mM αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φανερώνουν για άλλη μια φορά τον προστατευτικό ρόλο της β-κυκλοδεξτρίνης στο ένζυμο hGSTA1-1.

Στην **Εικόνα 42** παρατηρούμε την ανάκτηση της ενζυμικής δραστηριότητας στη διάρκεια των 20h επώασης σε υδατικό διάλυμα ουρίας 0,8M. Γίνεται σαφές ότι η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης βελτιώνει την ανάκτηση της ενζυμικής δράσης σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που εμφανίζονται απουσία αυτής (0mM β-CD). Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση της δραστηριότητας του ενζύμου hGSTA1-1 παρατηρείται στα 24,74% απουσία β-κυκλοδεξτρίνης ενώ στα 35% και 40,03% σε συγκεντρώσεις 5mM και 10mM αντίστοιχα. Η κυκλοδεξτρίνη λοιπόν βελτιώνει την ανάκτηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε βαθμό σχεδόν διπλάσιο και ανάλογο με την συγκέντρωσή της στο τελικό διάλυμα.

Συζήτηση

Οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενους από μόρια D-γλυκοπυρανόζης και συνδεδεμένα με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το σχήμα τους προσομοιάζει με κόλουρο κώνο λόγω της έλλειψης ελεύθερης περιστροφής των δεσμών που συνδέουν τις μονάδες της γλυκοπυρανόζης. Αποτέλεσμα αυτής της δομής είναι η δημιουργία μιας υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας που συνδυάζεται με μια υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. Στο λιπόφιλο μέρος της κοιλότητας μπορούν να εγκλωβιστούν δυσδιάλυτες βιοδραστικές ενώσεις και μέσωδιαμοριακών αλληλεπιδράσεων μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα έγκλεισης. Με το σχηματισμό των συμπλόκων αυτών επιτυγχάνεται η αύξηση της διαλυτότητας και η βελτίωση της σταθερότητας των βιοδραστικών ουσιών. Σήμερα αυξάνονται συνεχώς οι φαρμακομορφές που κυκλοφορούν στο εμπόριο και περιέχουν σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με βιοδραστικές ενώσεις καθώς επίσης και η χρήση τους σε ερευνητικά και βιομηχανικά πεδία διότι προσδίδουν σημαντικά πλεονεκτήματα.

Η μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο συσπειρώνει πολύ μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, με εφαρμογές στη βιομηχανία, στη φαρμακευτική και στη γεωπονία. Αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε αυτή η αναλυτική μελέτη του. Στα πλαίσια αυτής μεταπτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του ενζύμου hGSTA1-1 σε ρυθμιστικό διάλυμα διαφορετικές συγκεντρώσεις β -CD. Σκοπός είναι η μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας και κατά πόσο αυτή επηρεάζεται από την παρουσία ή μη της β -CD υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Πραγματοποιήθηκε συμπλοκοποίηση του ενζύμου hGSTA1-1 με β -κυκλοδεξτρίνη. Προσδιορίστηκε η επίδραση που εμφανίζει η παρουσία της β -CD στα υποστρώματα CDNB και GSH που χρησιμοποιούνται για τον ενζυμικό προσδιορισμό της hGSTA1-1. Οι συγκεντρώσεις κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά είναι 0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM και 10mM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της κυκλοδεξτρίνης δεν επηρεάζει σημαντικά τα υποστρώματα (**Εικόνα 17**) επομένως δεν επηρεάζει αρνητικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων που θα

ακολουθήσουν. Επίσης από την **Εικόνα 18** γίνεται φανερό ότι η συμπλοκοποίηση του ενζύμου hGSTA1-1 με τη β -CD εμφανίζει θετική επίδραση στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης της β -CD προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου. Για περαιτέρω ανάλυση και μελέτη του συμπλόκου έγινε επιλογή των συγκεντρώσεων 5mM και 10mM β -CD. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν διότι παρουσία των συγκεκριμένων η ενζυμική δραστηριότητα της hGSTA1-1 εμφανίζει σημαντική βελτίωση σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 0,1mM, 0,5mM και 1mM β -CD. Ως μάρτυρας θεωρείται η συγκέντρωση 0mM β -CD.

Ακολούθησε η κινητική μελέτη ως προς τα υποστρώματα GSH και CDNB. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι 0,1M KH_2PO_4 pH 6,5 παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β -CD (0mM, 5mM, 10mM) σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση των υποστρωμάτων CDNB και GSH. Το εύρος των συγκεντρώσεων για το υπόστρωμα CDNB είναι 0,02mM-1,8mM και για το υπόστρωμα GSH 0,002mM-6,75mM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της β -CD επηρεάζει μόνο αρνητικά τη συγγένεια του ενζύμου hGSTA1-1 για το υπόστρωμα CDNB, αυξάνοντας την K_m κατά 21% και 35% παρουσία συγκεντρώσεων 5mM και 10mM β -CD αντίστοιχα. Παρουσία των 5mM της β -CD, η K_m μειώνεται κατά 55,9% αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια του ενζύμου για τη GSH, ενώ παρουσία των 10mM της β -CD η τιμή της K_m αυξάνεται κατά 51% μειώνοντας κατά πολύ τη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα αυτό.

Η επίδραση του pH, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, είναι σημαντική και χαρακτηριστική για την ενζυμική αντίδραση. Η παρουσία της κυκλοδεξτρίνης προκαλεί μετατόπιση του βέλτιστου pH της αντίδρασης. Ταυτόχρονα, η αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης στο υδατικό διάλυμα της V_{max} της ενζυμικής αντίδρασης, με εκείνη των 10mM να παρουσιάζει αισθητή διαφορά στη δραστηριότητα του ενζύμου σε σχέση με εκείνη των 5mM και 0mM.

Όπως είναι γνωστό, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξήσουν τη σταθερότητα μορίων όπως οι πρωτεΐνες όταν αυτά βρίσκονται σε

ακραίες συνθήκες. Έτσι λοιπόν, ακολούθησε η μελέτη θερμοσταθερότητας του ενζύμου hGSTA1-1 παρουσία και απουσία β-κυκλοδεξτρίνης. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκε η επίδραση της β-κυκλοδεξτρίνης στο ένζυμο hGSTA1-1 είναι 4°C και 37°C. Η ολοκλήρωση του πειράματος πραγματοποιήθηκε σε 72 ώρες για τους 37°C και 57 ημέρες για τους 4°C. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις **Εικόνες 29** και **30**, το σύμπλοκο του ενζύμου με τη β-CD επέδειξε μια αυξημένη σταθερότητα εν συγκρίσει με το ελεύθερο ένζυμο δηλαδή, απουσίας β-CD (0mM β-CD). Η β-κυκλοδεξτρίνη, λοιπόν, παρέχει προστασία στο ένζυμο hGSTA1-1 υπό συνθήκες υψηλής (37°C) και χαμηλής (4°C) θερμοκρασίας.

Προσδιορίστηκε σε κάθε συνθήκη η θερμοκρασία εκείνη στην οποία μειώνεται η δραστικότητα του ενζύμου στο μισό δηλαδή η T_m . (**Εικόνα 31**). Όπως γίνεται φανερό και από τον **Πίνακα 3**, η προσθήκη της β-κυκλοδεξτρίνης βελτιώνει τη θερμοσταθερότητα του ενζύμου, η οποία αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης.

Μελετήθηκε η επίδραση της λυοφιλίωσης στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου. Μετά τη λυοφιλίωση και την επαναδιαλυτοποίηση της hGSTA1-1 στο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων β-κυκλοδεξτρίνης μετρήθηκε η ενζυμική δραστικότητα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της **Εικόνας 32** τα επίπεδα της ενζυμικής δραστικότητας μειώθηκαν κατά πολύ. Πιο συγκεκριμένα, απουσία της β-CD η ενζυμική δραστικότητα μειώθηκε κατά 55,3% ενώ παρουσία των 5mM και 10mM τα επίπεδα πτώσης είναι 50,7% και 66,6% αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι παρουσία των 10mM β-CD προκαλείται μεγαλύτερη μείωση στην ενζυμική δραστικότητα της hGSTA1-1 σε σχέση με εκείνη των 0mM και 5mM. Η συμπεριφορά αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί με βάση τις αλληλεπιδράσεις των φορτίων που δημιουργούνται και το πώς αυτές επηρεάζονται από τη θερμοκρασία. Στη φυσική επικρατεί η αρχή ότι με τη μείωση της θερμοκρασίας ενισχύονται οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κυκλοδεξτρίνης περισσότερα ιόντα αλληλεπιδρούν με την πρωτεϊνική επιφάνεια ώστε να επιδρά αρνητικά και να αποδιατάσσει τη δομή του ενζύμου και έτσι να μειώνει τη δραστικότητα του ακόμα περισσότερο. Αυτός είναι προφανώς και ο λόγος που στους

-20°C η συγκέντρωση των 10mM δεν παρέχει την ίδια προστασία στο ένζυμο εν συγκρίσει παρουσίας μικρότερης συγκέντρωσης όπως εκείνης των 5mM. Επίσης, από την **Εικόνα 34** μπορούμε να διακρίνουμε ότι παρουσία κυκλοδεξτρίνης η κλίση της ευθείας μειώνεται. Επομένως, η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης προσδίδει στο ένζυμο θερμοκρασιακή σταθερότητα βελτιώνοντας έτσι την ενζυμική του δραστηριότητα. Συμπερασματικά, η προσθήκη β-κυκλοδεξτρίνης ασκεί θετική επίδραση στη σταθερότητα αποθήκευσης (storage stability) αλλά και στη λειτουργική σταθερότητα (operational stability) του ενζύμου όπως προέκυψε από τους παραπάνω χειρισμούς. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η κλίση των ευθειών αλλάζει στη θερμοκρασία των 35°C. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι στο ενζυμικό μόριο προκαλείται δομική ανακατάταξη με αποτέλεσμα τη μεταβολή του καθοριστικού σταδίου της αντίδρασης.

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα διαφόρων ασταθών βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην υδρόλυση και στην αποικοδόμηση. Αυτό επιτυγχάνεται είτε απομονώνοντας ένα βιοδραστικό μόριο από ένα πιθανό δραστικό περιβάλλον είτε εμποδίζοντας την αποικοδόμηση μετά από την απορρόφηση του. Σε μοριακό επίπεδο, οι κυκλοδεξτρίνες εγκλωβίζουν τα ασταθή μόρια με τη συμπλοκοποίηση και προστατεύουν έτσι τις βιοδραστικές ουσίες από τις διάφορες διαδικασίες αποικοδόμησης. Εξετάστηκε λοιπόν, η επίδραση του πεπτικού ενζύμου α-χυμοθρυψίνης στο υπό μελέτη ένζυμο hGSTA1-1. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις **Εικόνες 38** και **39** διακρίνεται ότι η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης παρέχει προστατευτικό ρόλο στη hGSTA1-1 παρουσία α-χυμοθρυψίνης. Αναλυτικότερα, η παρουσία 5units α-χυμοθρυψίνης προκαλεί την κατακόρυφη πτώση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50% περίπου από το 1^ο μόλις λεπτό. Κατά την πάροδο του χρόνου όμως γίνεται πιο εμφανής ο προστατευτικός ρόλος της β-CD, ο οποίος είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση αυτής. Όπως παρατηρήθηκε, η μεγαλύτερη συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης παρέχει και μεγαλύτερη προστασία με βελτίωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην **Εικόνα 39** γίνεται πλέον σαφές ότι η β-κυκλοδεξτρίνη προστατεύει το ένζυμο hGSTA1-1 από την υδρόλυση που προκαλεί το πεπτικό ένζυμο. Συγκεκριμένα με την παρουσία 10mM β-κυκλοδεξτρίνης βελτιώνεται η ενζυμική δραστηριότητα συγκριτικά με την παρουσία συγκεντρώσεων των 5mM και 0mM β-κυκλοδεξτρίνης.

Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του πρωτεολυτικού ενζύμου, θρυψίνη, στο ένζυμο hGSTA1-1. Στην **Εικόνα 40** παρουσιάζεται η πορεία της καταλυτικής δράσης της θρυψίνης στο υπό μελέτη ένζυμο. Φαίνεται, λοιπόν, η κυκλοδεξτρίνη να μην έχει προστατευτικό ρόλο στο ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία θρυψίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η θρυψίνη αναγνωρίζει μη αρωματικά αμινοξέα με αποτέλεσμα να μην προστατεύονται οι αμινοξικοί στόχοι της θρυψίνης.

Το τελευταίο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της μελέτης ήταν η επίδραση της ουρίας στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου hGSTA1-1. Όπως είναι γνωστό, η επίδραση ουρίας υψηλής συγκέντρωσης προκαλεί τη μετουσίωση των ενζύμων με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους. Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της ουρίας 8M στο ένζυμο hGSTA1-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοδεξτρίνης. Όπως ήταν αναμενόμενο, σε διάρκεια 45min προκλήθηκε σημαντική μείωση της ενζυμικής του δραστικότητας. Τα 8M ουρίας προκάλεσαν μείωση της δραστικότητας κατά 92% απουσία β-κυκλοδεξτρίνης ενώ κατά 85% και 86% παρουσία 5mM και 10mM β-CD αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν για άλλη μια φορά τον προστατευτικό ρόλο της β-κυκλοδεξτρίνης στο ένζυμο hGSTA1-1. Στη συνέχεια έγιναν προσπάθειες για την ανάκτηση της ενζυμικής ταχύτητας με αραίωση του υδατικού διαλύματος ώστε η τελική συγκέντρωση ουρίας να φτάσει τα 0,8M. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 20h και κατά τη διάρκεια αυτής μελετήθηκε με φωτομετρικό προσδιορισμό ο βαθμός ανάκτησης της δραστικότητας. Γίνεται σαφές ότι η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης βελτιώνει την ανάκτηση της ενζυμικής ταχύτητας σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που εμφανίζονται απουσία αυτής (0mM β-CD). Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση της δραστικότητας του ενζύμου hGSTA1-1 παρατηρείται στα 24,74% απουσία β-κυκλοδεξτρίνης ενώ στα 35% και 40,03% σε συγκεντρώσεις 5mM και 10mM αντίστοιχα. Η κυκλοδεξτρίνη λοιπόν βελτιώνει την ανάκτηση της ενζυμικής δραστικότητας σε βαθμό σχεδόν διπλάσιο και ανάλογο με την συγκέντρωσή της στο τελικό διάλυμα.

Βιβλιογραφία

Adnan H. Role of human glutathione S-transferase Alpha in modulating cellular stress and cell phase transitions (2012) dspace.lib.uoguelph.ca

Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Glutathione transferases in bacteria *FEBS J.*, 276 (2009), pp. 58-75

Andersen G.H., Robbins F.M., Domingues F.J., Moores R.G. Long The utilization of Schardinger dextrans by the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 5 (1963), pp. 257–266

Aniya Y., Imaizumi N. Mitochondrial glutathione transferases involving a new function for membrane permeability transition pore regulation *Drug. Metab. Rev.* 43 (2011), pp. 292-299

Arca P., Rico M., Brana A.F., Villar C.J., Hardisson C., Suarez J.E. Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (1988), pp.1552-1556

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

Arias I.M., Ohmi M., Bhargava M., Listowsky I. Ligandin: An adventure in liverland. *Mol. Cell Biochem.* 29 (1980), pp. 71-80

Baudin C., Pean C., Perly B., Goselin P. Inclusion of organic pollutants in cyclodextrin and derivatives *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 77 (2000), pp. 233–242

Bernat B.A., Laughlin L.T., Armstrong R.N. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochem.* 36(1997), pp.3050-3055

Biwier A., Antranikian G., Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 (2002), pp. 609–617

BlikstadC., ShokeerA., KurtovicS., MannervikB. Emergence of a novel highly specific and catalytically efficient enzyme from a naturally promiscuous glutathione transferase. *Biochim Biophys Acta*, 1780(2008), pp.1458–1463

BoardP.G. Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4 *Biochem. J.* 330 (1998), pp. 827-831

BoardP.G., WebbG.C., CogganM. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14, *53* (2007), pp. 205-213

BradyD., JordaanJ. Advances in enzyme immobilization *Biotechnol Lett*, 31 (2009), pp. 1639-1650

CaesarG.V. Starch and its Derivatives, Chap. X, J. A. Radley Ed. (1986). pp 290

CanchiD.R., PaschekD., GarciaA.E. Equilibrium study of protein denaturation by urea *J Am Chem Soc*, 132 (2010), pp. 2338-2344

Challa R., Ahuja A., Ali J., KharR. Cyclodextrin in drug delivery: an updated review *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 6 (2005), pp. E329–E357

Charoenlap N., Dharmsthiti S., Sirisansaneeyakul S., Lertsiri S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch *Bioresour. Technol.*, 92 (2004), pp. 49–54

CoccoR., StenbergG., DraganiB., Rossi D., PrincipeD., MannervikB., AcetoA. The folding and stability of human alpha class glutathione transferase A1-1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif *J. Biol. Chem.*, 276 (2001), pp. 32177-32183

Coleman A.W., Djedaini F., Perly B. Proceedings of the 5th International Symposium on Cyclodextrins, Paris (1990), pp. 328

ColesB.F., KadlubarF.F. Human alpha class glutathione S-transferases: Genetic polymorphism, expression, and susceptible to disease. *Methods Enzymol.* 401(2005), pp.9-42

- Cramer F.** *Einschlussverbindungen* Springer-Verlag, Berlin (1954)
- Del Valle E.M.M.** Cyclodextrins and their uses: A review *Process Biochemistry*, 39 (2004), pp. 1033–1046
- Deng W., Hiroyasu Y., Yoshinori T., Akira H.** A Chemical-Responsive Supramolecular Hydrogel from Modified Cyclodextrins. Vol. 119, 27, (2007) pp. 5236–5239
- Díez P., Villalonga R., Villalonga M.L., Pingarrón J. M.** Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications, *J. Col. Inter. Sci.*, 386 (2012), pp.181-188
- Dirr H., Reinemer P., Huber R.** X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function *Eur. J. Biochem.*, 220 (1994), pp. 645-661
- Dirr H.W., Sayed Y.** Energetics of ligand binding to human glutathione transferase A1-1: Tyr-9 associated localisation of the C-terminal helix is ligand-dependent 156 (2011), pp. 153-158
- Ding Y., Ortelli F., Rossiter L.C., Hemingway J., Ranson H.** The anopheles gambiae glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4 (2003), pp. 35-45
- Dixon D.P., Laphorn A., Edward R.** Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 10 (2002), pp. 1-3004
- Dourado D.F., Fernandes P.A., Ramos M.J.** Mammalian cytosolic glutathione transferases *Curr. Protein Pept. Sci.*, 9 (2008), pp. 325-337
- Droog F.** Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J Plant Growth Regul* 16 (1997), pp.95–107
- Duan X., Chen S., Chen J., Wu J.** Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and α -CGTase *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-012-4292-9 (2012)

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

Edwards R., Dixon D.P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In *Herbicides and their mechanisms of action.* (Codd AH, Kirkwood RC, eds) Sheffield, Sheffield Academic Press (2000), pp. 33-71.

Ekmekci Y., Tanyolac D., Ayhana B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars *J. Plant Physiol.*, 165 (2008), pp. 600-611

Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance *Insect Mol. Biol.*, 14 (2005), pp. 3-8

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

Foyer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, (1994), pp. 507-523

Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. Photooxidative stress in plants *Physiol. Plant.*, 92 (1994), pp. 696-717

Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub *Plant Physiol.*, 155 (2011), pp. 2-18

Freitas D.R.J., Rosa R.M., Moraes J., Campos E., Logullo C., Da Silva Vaz Jr I., Masuda A. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae), 146 (2007), pp. 688-694

French D. The Schardinger dextrans *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12 (1957), pp. 189-260

Freudenberg K., Cramer F. Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α , β und γ *Z. Naturforsch.*, 3b (1948), p. 464

Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H. Verfahren zur Herstellung von Einschlußverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany, Patent No. 895,769, 5 November 1953

Fritz-Wolf K., Becker A., Rahlfs S., Harwaldt P., Schirmer R.H., Kabsch W., Becker K. X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25 (2003), pp. 13821-13826

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

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

Gallagher E.P., Gardner J.L., Barber D.S. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria *Biochem Pharmacol*, 71 (11) (2006), pp. 1619-1628

Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death *Bioessays*, 28 (2006), pp. 1091-1101

George R., Oberholzer T., Perchyonok T. Cyclodextrins as Oral Drug Carrier Molecular Devices: Origins, Reasons and Applications *Curr. Drug Deliv.* (2012)

Gershenson A., Arnold F.H. Enzyme stabilization by directed evolution *Gen Eng*, 22 (2000), pp. 55-76

Gibson T.D. Biosensors: The Stability Problem. *EDP Sciences, ANALUSIS*, 27 (1999), pp. 630-637

Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants *Plant Physiol. Biochem.*, 48 (2010), pp. 909-930

Halliwell B., Gutteridge C. M. J. *Free Radicals In Biology and Medicine.* New York, Oxford University Press, (1999)

Haran G. How, when and why proteins collapse: the relation to folding 22, (2012), pp. 14-20

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

HayesJ.D., FlanaganJ.U., JowseyI.R. Glutathione transferases *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45 (2005), pp. 51-88

HebertH., Schimidt-krey I., MorgensternR. The projection structure of microsomal glutathione transferase. *EMBO J.* 14 (1995), pp. 3864-3869

HedgesR.A. Industrial applications of cyclodextrins *Chemical Reviews*, 98 (5) (1998), pp. 2035–2044

Herbette S., Roeckel-Drevet P., DrevetJ.R. Seleno-independent glutathione peroxidases: more than simple antioxidant scavengers *FEBS J.*, 274 (2007), pp. 2163-2180

HigginsL.G., HayesJ.D. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents *Drug Metab Rev*, 43 (2011), pp. 92-137

Hirayama F., Mieda S., Miyamoto Y., Arima H., Uekama K., Heptakis (2,6-di-O-methyl-3-O-acetyl)-cyclodextrin: A Water-Soluble Cyclodextrin Derivative with Low Hemolytic Activity, *J. Pharm. Sci.*, 10 (1999), pp. 970-975.

HuberW.W., McDanielL.P., KaderlikK.R., TeitelC.H., LangN.P., Kadlubar F.F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat Res* 376 (1997), pp. 115–122

IyerP.V., AnanthanarayanL. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment *Process Biochem*, 43 (2008), pp. 1019-1032

Kaminski K., Adrjanowicz K., Kaminska E., Grzybowska K., Hawelek L., Paluch M., Tarnacka M., Gruszka I., Kasprzycka A. Impact of water on molecular dynamics of amorphous α -, β -, and γ -cyclodextrins studied by dielectric spectroscopy *Phys. Rev. E*, 86 (2012)

Khan A.R., Forgo P., Stine K.J., D'Souza V.T. Methods for selective modifications of cyclodextrins *Chem. Rev.*, 98 (1998), pp. 1977–1996

Klibanov, A.M. *Analytical Biochemistry*. 93, (1979), pp. 1-25

Knight T.R., Choudhuri S., Klaassen C.D. Induction of Hepatic Glutathione S-Transferases in Male Mice by Prototypes of Various Classes of Microsomal Enzyme Inducers, *Toxicol. Sci.*, 106 (2008), pp. 329-33

Kunert K.J., Foyer C.H Thiol/disulfide exchange in plants. In *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants* (LJ de Kok, Eds), SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands (1993), pp. 139-151

Kurtovic S., Modén O., Shokeer A., Mannervik B. Structural determinants of glutathione transferases with azathioprine activity identified by DNA shuffling of alpha class members *J. Mol. Biol.*, 375 (2008), pp. 1365-1379

Larsen K.L. Large cyclodextrins *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 43 (2002), pp. 1–13

Li L., Zhang X., Liu J., Wang J., Pham D.T., Lincoln S.F., Guo Z. Photoresponsive polymer networks formed by alpha-cyclodextrin and azobenzene modified PAAs *International Cyclodextrin Symposium (16th : 2012 : Tianjin, China)*

Li S., Purdy W.C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry *Chem. Rev.*, 92 (1992), pp. 1457–1470

Li X., Zhang X., Zhang J., Starkey S.R., Zhu K.Y. Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39 (2009), pp. 745–754

- Liu H., Li J., Du G., Zhou J., Chen J.** Enhanced production of α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli* by systematic codon usage optimization *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10295-012-1185-y (2012)
- Loftsson T., Magnúsdóttir A., Másson M., Sigurjónsdóttir J.F.** Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002), pp. 2307–2316
- Loftsson T., Hreinsdóttir D., Másson M.** Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs *Int. J. Pharm.*, 302 (2005), pp. 18–28
- Loftsson T., Jarho P., Másson M., Järvinen T.** Cyclodextrins in drug delivery *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2 (2005), pp. 335–351
- Loftsson T., Duchene D.** Cyclodextrins and their pharmaceutical applications *Int J of Pharm* 329, (2007), pp. 1-11.
- Loftsson T., Brewster M.E.** Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development *J. Pharm. Pharmacol.*, 62 (2010), pp. 1607-1621
- Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S., Cooper A.J.L.** Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain *J. Neurochem.*, 62 (1994), pp. 45-53
- Mannervik B., Danielson U.H.** Glutathione Transferases-Structure and Catalytic Activity *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23 (1988), pp. 283–337
- Mannervik B., Guthenberg C.** Glutathione transferase (human placenta). In: Jakoby, W.B. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York 77 (1981), pp. 231–235
- Martin A.R., Villegas I., La Casa C., De La Lastra C.A.** Resveratrol, a polyphenol from grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats *Biochem. Pharm.*, 67 (2004), pp. 1399–1410
- Masson M., Loftsson T.** Incl. Phenom. *Macroc. Chem.*, 44(2002), pp. 213-218.

MateoC., PalomoJ.M., Fernandez-LorenteG., GuisanJ.M., Fernandez-LafuenteR. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques *Enzyme Microb Technol*, 40 (2007), pp. 1451-1463

May M. J., Qu C. Z., NeelR. D. Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim. Bioph. Acta.* 1640: 1 (2003), pp. 53-161.

Mendoza-Cózatl D., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A., Moreno-SanchezR. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants *FEMS Microbiol. Rev.*, 29 (2005), pp. 653-671

Mendoza-Cózatl D.G., Butko E., Springer F., Torpey J.W., Komives E.A., Kehr J., SchroederJ.I. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation *Plant J.*, 54 (2008), pp. 249-259

Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., TrivediP.K. Thiol metabolism and antioxidant system complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L *Aquat. Toxicol.*, 86 (2008), pp. 205-215

Montalvo-OrtizB.L., SosaB., Griebenow K. Improved Enzyme Activity and Stability in Polymer Microspheres by Encapsulation of Protein Nanospheres, 13, (2012), pp. 632-636

Moons A. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTS) *Plant Horm.*, 72 (2005), pp. 155-202

MorelF., SchulzW.A., SiesH. Gene structure and regulation of expression of human glutathione S-transferase alpha. *Chem. Hoppe-Seyler.* 375 (1994), pp. 641-649

MorelF., RauchC., ColesB., Le FerrecE., Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: Genomic organization of the gene cluster and functional characterization of genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics.* 12 (2002), pp. 277-286

- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.P.** Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria *Physiol. Plant*, 129 (2007), pp. 185-195
- Nebert D.W., Vasiliou V.** Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family *Hum. Genom.*, 1 (2004), pp. 460-464
- Nguyen T.A., Liu B., Zhao J., Thomas D.S., Hook J.M.** An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex 136 (2012), pp. 186-192
- Nicolazzi C., Venard V., Faou A Le, Finance C.** In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with beta-cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains *Antiviral Res.*, 54 (2002), pp. 121-127
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H.** Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants *J. Exp. Bot.*, 49 (1998), pp. 623-647
- Oakley A.** Glutathione transferases: a structural perspective *Drug Metabol. Rev.*, 43 (2011), pp. 138-151
- Oguma T., Kawamoto H.** Production of cyclodextrin and its applications *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 15 (2003), pp. 91-99
- Okada R., Maeda K., Nishiyama T., Aoyama S., Tozuka Z., Hiratsuka A., Ikeda T., Kusuhashi H., Sugiyama Y.** Involvement of Different Human Glutathione Transferase Isoforms in the Glutathione Conjugation of Reactive Metabolites of Troglitazone 39 (2011), pp. 2290-2297
- Okimoto K., Rajewski R.A., Uekama K., Jana J.A., Stella V.J.** The interaction of charged and uncharged drugs with neutral (HB- β -CD) and anionically charged (SBE- β -CD) β -cyclodextrins *Pharm. Res.*, 13 (1996), pp. 256-264
- Ondo D., Tkadlecová M., Dohnal V. Rak J., Kvíčala J., Lehmann J.K., Heintz A., Ignatiev N.** Interaction of ionic liquids ions with natural cyclodextrins *J. Phys. Chem. B*, 115 (34) (2011), pp. 10285-10297

Osa T. (1994). Seventh Int. Symp. on Cyclodextrins, Tokyo, Publ. Office of Business enter for Academic Societies of Japan.

OztetikE. An introduction to oxidative stress in plants and the role of non-enzymatic antioxidants N.A. Anjum, S. Umar, A. Ahmad (Eds.), *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*, IK Intern. Publ. H Pvt. Ltd., New Delhi (2011), pp. 1-50

Powles S.B., YuQ. Evolution in action: plants resistant to herbicides *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61 (2010), pp. 317-347

Prade L., Huber R., Bieseler B. Structure of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure (London)* 6 (1998), pp.1445-1452

Rao V.M., Stella V.J. When can cyclodextrins be considered for solubilizing purposes? *J. Pharm. Sci.*, 92 (2003), pp. 927–932

Rasheed A., Ashok KumarC.K. Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review *Scienta Pharmaceutica*, 76 (2008), pp. 567–598

Rhodes, C.T., Franks, F., Shefter, E., Pikal, M.J. *Stability of Protein Drugs, Biologics and Devices*, Centre for Professional Advancement (Amsterdam), 1992

RemmerieB., VandenbrouckeK., De SmetL., CarpentierW., De VosD., StoutJ., Van BeeumenJ., SavvidesS.N. Expression, purification, crystallization and structure determination of two glutathione S-transferase-like proteins from *Shewanella oneidensis* *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64 (2008), pp. 548-553

Romero A., Martín M., Oliva B., J de la Torre FurioV., de la HoyaM., García-Sáenz J.A., MorenoA., RománJ.M., Diaz-RubioE., CaldésT. Glutathione S-transferase P1 c.313A > G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patient *y 23* (2012), pp. 1750–1756

Rosso A., Ferrarotti S., Miranda M.V., Krymkiewicz N., Nudel B.C., Cascone O. Rapid affinity purification processes for CGTase from *Bacillus circulans* DF 9R *Biotechnol. Lett.*, 27 (2005), pp. 1171–1175

Schardinger F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.*, 6 (1903), pp. 865–880

Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi, Smith S., Takaha T. Structures of the common Cyclodextrins and Their Larger Analogues, *Chem. Rev.*, 98, (1998), pp. 1787-1802

Schardinger F. Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microben *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II*, 29 (1911), pp. 188–197

Schmid A., Hollmann F., Park J.B., Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe *Curr Opin Biotechnol*, 13 (2002), pp. 359-366

Schroer T., Gibson M., Sivaprasad U., Bass A., Ericksen B., Wills-Karp M., Le Cras T., Fitzpatrick M., Brown S., Stringer F., Hershey K. Downregulation of GST pi in asthma contributes to enhanced oxidative stress. *Jour. of Al. and Clin. Immun.*, 128 (2011), pp. 539-548

Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily *Biochem. J.*, 360 (2001), pp. 1-16

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, (1997), pp. 291–295

Singh M., Sharma R., Banerjee V.C. Biotechnological applications of cyclodextrins *Biotech. Ad.*, 20 (2002), pp. 341–359

Singh S.P., Zimniak L., Zimniak P. The human hGSTA5 gene encodes an enzymatically active protein *Biochim. Biophys. Acta*, 1800 (2010), pp. 16-22

Snyder S.L., McAuley K.B., McLellan P.J. Modeling the thermal stability of enzyme-based *in vitro* diagnostics biosensors 156, (2011), pp. 621-630

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

Srivalli S., Khanna-Chopra R. Role of glutathione in abiotic stress tolerance N.A. Khan, S. Singh, S. Umar (Eds.), Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2008), pp. 207-225

Stella V.J., Rajewski R.A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery Pharm. Res., 14 (1997), pp. 556-567

Suzuki T., Smith S., Board P.G. Structure and function of the 50 flanking sequences of the human alpha class glutathione S transferase genes Biochem. Biophys. Res. Commun 200 (1994), Pp.1665-1671

Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions J. Plant Growth Regul., 28 (2009), pp. 66-80

Szerman N., Ignacio S., Rossi A.L., Rosso A.M., Krymkiewicz N., Ferrarotti L. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R Bioresource technology, 98 (2007), pp 2886-2891

Szejtli J., (Ed.), proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins, Reidel, Boston (1981), pp.367-376

Szejtli J. The properties and potential uses of cyclodextrin derivatives J. of Incl. Phenom. and Molec. Recogn. in Chem., 14 (1992), pp. 25-36

Szejtli J. Selectivity/structure correlation in cyclodextrin chemistry Supramolecular Chemistry, 6 (1995), pp. 217-223

Szejtli J. Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins, Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3, Cyclodextrins, Pergamon, Oxford, UK (1996)

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry *Chem. Rev.*, 98 (1998), pp. 1743–1753

Szente L. Highly soluble cyclodextrin derivatives, chemistry, properties and trends in development *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 36 (1999), pp. 17–28

Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research *Pure Appl. Chem.*, 76 (2004), pp. 1825–1845

Tausz M., Sircelj H., Grill D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid. *J. Exp. Bot.*, 55 (2004), pp. 1955–1962

Tew D.K., Townsend M.D. Glutathione-S-Transferases As Determinants of Cell Survival and Death 10 (2012), pp. 2012-4640

Thoma J.A., Stewart L. Starch, Chemistry and Technology I, R. L. Whistler and E. F. Paschall (Eds.) (1965), pp. 209

Tischer W., Wedekind F. Immobilized enzymes: methods and applications *Biocatalysis - from discovery to application* Springer (1999), pp. 95-126

Uekama K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation *Chem. Pharm. Bull.*, 52 (2004), pp. 900-915

Urban M., Beran M., Adámek L., Drahorád J., Molík P., Matušová K. Cyclodextrin production from amaranth starch by cyclodextrin glycosyltransferase produced by *Paenibacillus macerans* *Cz. J. F. Sci.* 30 (2012), pp. 15-20

Villiers A. Sur la fermentation de la féculé par l'action du ferment butyrique *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 112 (1891), pp. 536–538

Wójcik M., Pawlikowska-Pawlega B., Tukiendorf B.A. Physiological and ultrastructural changes in *Arabidopsis thaliana* as affected by changed GSH level and Cu excess. *Russ J. Plant Physiol.*, 56 (2009), pp. 906-916

Wu H. Studies on the denaturation of proteins, XIII. A theory of denaturation. *Chinese J. Physiol.* 5, (1931), pp. 321-344

Wyrwalski F., Léger B., Lancelo C., Roucoux A., Monflier E., Ponchel A. Chemically modified cyclodextrins as supramolecular tools to generate carbon-

supported ruthenium nanoparticles: An application towards gas phase hydrogenation
Appl. Catal. A: Gen. 391 (2011), pp. 334-341

Yenpetch W., Packdibamrung K., Zimmermann W. Pongsawasdi P. Biochemical properties and cyclodextrin production profiles of isoforms of cyclodextrin glycosyltransferase J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 70 (2011), pp.377–383

Yusoff W.M.W., Ibrahim H.M., Hamid A.A., Illias R.Md., Hassan O., Omar O. A potential new isolate for β -cyclodextrin glucotransferase production Malays. J. Biochem. Mol. Biol, 7 (2002), pp. 13–17

Zhang C.H., Ge Y. Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress Rice Sci., 15 (2008), pp. 73-76