



Κινητικές μελέτες εκχυλισμάτων διαφόρων ποικιλιών σταφυλιού με στόχο την αποτίμηση της ανασταλτικής δράσης τους έναντι της ριβονουκλεάσης Α

Effect of grape extracts on the activity of Ribonuclease A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΚΡΙΔΟΥ ΕΥΤΥΧΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ-2012

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής επιτροπή:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος, Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....
Abstract.....
Εισαγωγή.....
1. Ιστορικά.....
1.1 Γαλλικό παράδοξο.....
2. Θεραπευτική αξία σταφυλιού.....
2.1 Αντιβακτηριδιακή δράση.....
2.2 Αντιθρομβωτική δράση.....
2.3 Αντιαλλεργική δράση.....
2.4 Αντικαρκινική δράση.....
3. Σύσταση σταφυλιού.....
3.1 Σύσταση του βότρυ.....
3.2 Σύσταση των γιγάρτων.....
3.3 Σύσταση της φλούδας.....
3.4 Σύσταση της σάρκας.....
4. Ποικιλίες που μελετήθηκαν.....
5. Ριβονουκλεάσες και Καρκίνος.....
6. Ριβονουκλεάση A (RNase A).....
6.1 Το Ενεργό Κέντρο.....
6.2 Καταλυτικός Μηχανισμός.....
6.3 Ενζυμική Αναστολή (Συναγωνιστική-Μη Συναγωνιστική).....
6.4 Αναστολείς της RNase A.....

Σκοπός του πειράματος

7. Πειραματική Διαδικασία.....

7.1 Υλικά και Μέθοδοι.....

7.1.1 Υλικά.....

7.1.1.1 Αντιδραστήρια.....

7.1.1.2 Όργανα.....

7.2 Μέθοδοι.....

7.2.1 Κινητική Μελέτη της Ριβονουκλεάσης A.....

7.2.1.1 Υπολογισμός Συγκεντρώσεων του ενζύμου και του υποστρώματος.....

7.2.1.2 Προσδιορισμός της Ειδικής Δραστικότητας της Ριβονουκλεάσης A.....

7.2.1.3 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....

7.2.1.3.1 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων - υπολογισμός της IC_{50} ...

7.2.2 Αποτελέσματα.....

7.2.2.1 Τελικά αποτελέσματα της IC_{50} των εκχυλισμάτων.....

Συζήτηση.....

Βιβλιογραφία.....

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή, όπως επίσης και τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ.Μπαλατσό (Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας), για την επιλογή και ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και για την υποστήριξη, τη συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφιο διδάκτορα Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για την υπομονή και την πολύτιμη βοήθεια της. Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιολογικές ιδιότητες του σταφυλιού αποτελούν συχνά αντικείμενο μελέτης, λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων έναντι πολλών παθήσεων, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές νόσοι. Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη εκχυλισμάτων σταφυλιού, (διαφόρων) ποικιλιών, από διαφορετικά τμήματα του φυτού, με σκοπό την εκτίμηση της πιθανής ανασταλτικής τους δράσης έναντι της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RiboNuclease A, RNase A). Τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A έχουν προσελκύσει μεγάλο φαρμακευτικό ενδιαφέρον, καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με μια πληθώρα κακοηθειών και μολυσματικών ασθενειών. Γι αυτό το λόγο, προηγούμενες έρευνες στο εργαστήριο είχαν ως στόχο την εύρεση και ανάπτυξη ισχυρών μορίων-αναστολέων έναντι της RNase A. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αναστολής του ενζύμου RNάση A, χρησιμοποιώντας έξι διαφορετικά εκχυλίσματα αμπέλου. Τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα προκάλεσαν σημαντική αναστολή της ριβονουκλεολυτικής δράσης του ενζύμου, μία πιθανή ένδειξη της χημειοπροστατευτικής ή/ και αντικαρκινικής τους δράσης.

ABSTRACT

The biological properties of grapes, are being widely studied, due to their beneficial impact on many disorders, such as cancer and cardiovascular diseases. In this work, grape extracts from different varieties and parts of the plant are studied, in order to appreciate their inhibitory potential against pancreatic Ribonuclease A. The members of RNase A superfamily have attracted significant biomedical interest, as the endoribonucleolytic activity of such proteins has been correlated to malignancies and infectious diseases. Therefore, previous work in our laboratory, included among others the discovery and designing of potent inhibitors of RNase A. In this work, we performed kinetic studies for the determination of the inhibition of RNase A, by using six different grapevine extracts. These extracts showed a considerable inhibitory effect on the enzyme's ribonucleolytic activity, demonstrating probable chemiprotective or/ and anticancer activity.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ

Η άμπελος, σύμφωνα με παλαιοντολογικές μελέτες, εκτιμάται πως έχει προϊστορία 7,5 εκατομμυρίων ετών. Κατά την πάροδο των χρόνων, διάφοροι πληθυσμοί αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες, κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του νοτίου Καυκάσου. Εκεί γεννήθηκε το είδος *Vitis vinifera* (Άμπελος η οينوφόρος), οι διάφορες ποικιλίες του οποίου καλλιεργούνται και σήμερα, ιδιαίτερα στην Ευρώπη. Το κρασί παράγεται κυρίως από το συγκεκριμένο είδος, ωστόσο σήμερα παράγονται και ποικιλίες που προέχονται από υβριδισμό με άλλα είδη όπως τα *Vitis rotundifolia*, *V. labrusca*, *V. riparia* κ.ά

Οι τεχνικές της αμπελουργίας και της οινοποιίας είναι γνωστές εδώ και πολλούς αιώνες στον άνθρωπο. Ο οίνος ανέκαθεν ήταν κομμάτι της ανθρώπινης κουλτούρας, καθώς εξυπηρετούσε όχι μόνο θρησκευτικές αλλά και ιατρικές ανάγκες. Θεότητες όπως ο Διόνυσος και ο Βάκχος ήταν αφιερωμένες στο κρασί. Οι ευεργετικές του ιδιότητες ήταν γνωστές από την αρχαιότητα, τις οποίες η σύγχρονη επιστημονική έρευνα, τεκμηριωμένα, αποδίδει στην αντιοξειδωτική δράση διαφόρων συστατικών του. ^[1-3]

1.1 ΓΑΛΛΙΚΟ ΠΑΡΑΔΟΞΟ

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες οι δείκτες θνησιμότητας για διάφορα νοσήματα και κυρίως για καρδιοπάθειες, φαίνεται να είναι χαμηλοί στις χώρες της Μεσογείου. Κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1970 το επιστημονικό ενδιαφέρον για τον οίνο αναζωπυρώθηκε, ως συνέπεια διαφόρων επιδημιολογικών παρατηρήσεων, που πιθανολογούσαν πως η ημερήσια κατανάλωση ερυθρού οίνου στην Γαλλία συνδέεται με τον μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Παρά το γεγονός ότι οι διατροφικές συνήθειες των Γάλλων ήταν πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά και ότι τα ποσοστά καπνίσματος ήταν υψηλά, όπως και σε άλλες βιομηχανοποιημένες χώρες, η εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου ήταν μειωμένη, ενώ παράλληλα οι πιθανότητες για αίσια εξέλιξη της νόσου, ήταν περισσότερες. ^[4] Αυτές οι αντιδιαμετρικές παρατηρήσεις της διατροφής στο γαλλικό πληθυσμό ονομάτηκαν Γαλλικό Παράδοξο.

Σήμερα το κρασί αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής δίαιτας. Η ευεργετική επίδραση του ερυθρού οίνου αποδόθηκε στην παρουσία διαφόρων βιοδραστικών ουσιών σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον, για τις βιολογικές ιδιότητες του ίδιου του καρπού αλλά και παραγώγων του, στράφηκε κυρίως στους μηχανισμούς στους οποίους αυτές οφείλονται.

2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ

Η θεραπευτική αξία των σταφυλιών ήταν γνωστή στον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Τόσο οι Αιγύπτιοι όσο και οι Έλληνες εξυμνούσαν τη θεραπευτική δύναμη των σταφυλιών, συνήθως υπό τη μορφή κρασιού. Χρησιμοποιούσαν κρασί για αποστείρωση νωπών προϊόντων, καθώς και για τον καθαρισμό των πληγών. Έριχναν, ακόμη, κρασί στο νερό για να προφυλαχθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς, που αναπτύσσονταν σε πηγές ή ποτάμια. Τα φύλλα των σταφυλιών χρησιμοποιούνταν για να σταματήσει η αιμορραγία και η φλεγμονή, καθώς επίσης, τα άγουρα σταφύλια χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία του πονόλαιμου και οι σταφίδες, κατά της δίψας και της δυσκοιλιότητας. Ακόμη ήταν γνωστή η θεραπευτική τους δράση για μια σειρά από παθήσεις, όπως ο καρκίνος, η χολέρα, η ευλογιά, η ναυτία και οι παθήσεις νεφρών και ήπατος.^[5]

Σήμερα υπάρχει αυξανόμενο ιατρικό ενδιαφέρον και ένα σύνολο από μελέτες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες του σταφυλιού. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι συμβάλλει στην πρόληψη και θεραπεία ενός συνόλου ασθενειών. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το σταφύλι παρουσιάζει ένα σύνολο δράσεων. Ορισμένες από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

2.1 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Έρευνες έχουν διαπιστώσει την αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων σταφυλιού για μια ποικιλία, gram- και gram+, βακτηρίων αλλά και μυκήτων, όπως, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* Scott, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η αντιμικροβιακή τους δράση οφείλεται κυρίως στις τανίνες που περιέχουν. Εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού σε κατάλληλες συγκεντρώσεις μπορούν να εξουδετερώσουν αντίστοιχα διαφορούς μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού σε συγκεντρώσεις 4% και 20% έχουν αποτελεσματική αντιμικροβιακή

δράση και μπορεί να είναι χρήσιμες ως αντιβακτηριακοί παράγοντες για την πρόληψη της επιδείνωσης των προϊόντων διατροφής.^[7]

2.2 ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η αντιθρομβωτική δράση τους συνίσταται κυρίως στην παρουσία των πολυφαινόλων και κυρίως των προανθοκυανιδίων, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στον σπόρο των σταφυλιών. Πειράματα σε μοντέλα ποντικού με έντονη φλεβική θρόμβωση, έδειξαν ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (GSPE) μείωσε σημαντικά την έκταση του θρόμβου, ενώ παράλληλα συνέβαλε στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, στην αναστολή παραγόντων προαγωγής της θρομβογένεσης και στην ενεργοποίηση παραγόντων αναστολής της θρομβογένεσης.^[7]

2.3 ΑΝΤΙΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Τα φλαβονοειδή προκαλούν αναστολή της δράσης των ενζύμων φωσφοδιεστεράση του cAMP και ΑΤΡάση που αυξάνουν την έκκριση ισταμίνης τόσο από τα μαστοκύτταρα όσο και από τα βασεόφιλα.^[9] Η κατανάλωση εκχυλίσματος σταφυλιού από πάσχοντες με αλλεργία, φαίνεται να προσφέρει σημαντική ανακούφιση. Επιπλέον διεγείρει την έκκριση αντιφλεγμονωδών ορμονών, συμβάλλοντας στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

2.4 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Εντυπωσιακά εκτεταμένες μελέτες έχουν γίνει και συνεχίζουν να γίνονται ως προς την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων σταφυλιού πάνω σε διάφορους τύπους καρκίνου. Πιστεύεται ότι οι σημαντικότερες ουσίες των σταφυλιών όσον αφορά τη βιολογική τους δράση, είναι κυρίως οι φυτικές πολυφαινόλες. Αυτό οφείλεται κυρίως στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, δηλαδή στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, μία εκ των οποίων και ο καρκίνος.^[10]

3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ

Οι βιολογικές ιδιότητες και τα φυτοχημικά συστατικά του καρπού των σταφυλιών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Διαφορετικές ποικιλίες μπορεί να παρουσιάζουν

διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Τα εκχυλίσματα σταφυλιών περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων ουσιών όπως οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, αζωτούχες ενώσεις, ένζυμα, βιταμίνες λιποειδή, ιχνοστοιχεία και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν το 8 με 9% του εκχυλίσματος των σπόρων και αυτό εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία. Οι πολυφαινόλες στους σπόρους των σταφυλιών βρίσκονται υπό μορφή των βιοφλαβονοειδών, κατηγορία γνωστών χρωστικών που των φρούτων. Τα μυστικά της σύνθεσης του εκχυλίσματος σταφυλιού, είναι τα βιοενεργά συστατικά, οι προανθοκυανιδίνες και η ρεσβερατρόλη.

3.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΒΟΤΡΥΟΣ

Η χημική σύσταση του βότρυος είναι παρόμοια με αυτή του φύλλου. Περιέχει μεγάλη ποσότητα ανόργανων ιόντων που είναι φτωχή σε σάκχαρα και ιδιαίτερα πλούσια σε πολυφαινόλες. Η περιεκτικότητα του σε σάκχαρα δεν ξεπερνά τα 10/1000g. Οι τανικές κυμαίνονται μεταξύ 1,3 και 3,5% και οι αζωτούχες ύλες ανέρχονται σε 1,0 -2,00. Ο βαθμός ωριμότητας του καρπού καθορίζει και την περιεκτικότητα του βότρυ σε νερό, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 65,0 και 80,0%. Ο κυτταρικός χυμός έχει pH μεγαλύτερο του 4(pH>4). Η συμμετοχή του βότρυ στην εκχύλιση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής οξύτητας και την αύξηση της ενεργού οξύτητας (pH).^[11]

3.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ

Κάθε ρόγα περιέχει τέσσερα κουκούτσια τα οποία και αποτελούν το 3,0 -6,0% του συνολικού βάρους του σταφυλιού. Η σύσταση τους σε γραμμάρια ανά 100 γρ. είναι:

- Νερό 25,0 - 45,0gr
- Σάκχαρα-πολυσακχαρίτες 34,0 -36,0gr
- Έλαια 13,0 -20,0 gr
- Τανίνες 4,0 -6,0 gr
- Αζωτούχα συστατικά 4,0 -6,5gr
- Ανόργανα συστατικά 2,0 -4,0 gr
- Λιπαρά οξέα 1,0 gr

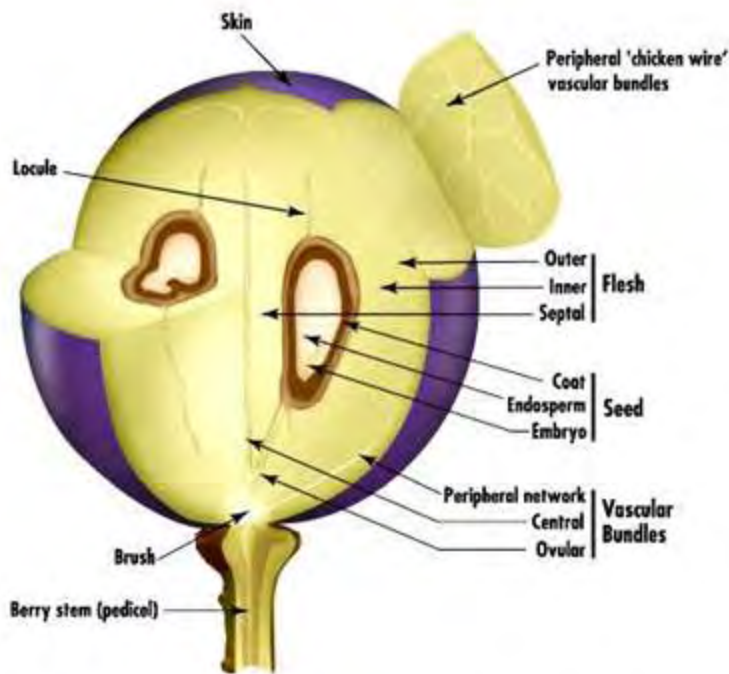
Ορισμένα από τα συστατικά που εντοπίζονται στην περιφέρεια, όπως τα φαινολικά και τα αζωτούχα είναι ιδιαίτερα διαλυτά κατά τη διάρκεια της εκκύλισης.^[11] Επιπλέον μέσα στα γίγαρτα υπάρχουν και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις εκτός των τανινοειδών. Κατά κάποιους υπάρχει και βανιλίνη.^[12]

3.3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΦΛΟΥΔΑΣ

Η φλούδα αποτελείται από την επιδερμίδα και μερικά στρώματα κυττάρων κάτω από αυτήν. Αποτελεί το 6,0 - 9,0% του βάρους του σταφυλιού, ενώ το 70,0-80,0% του βάρους, αποτελείται από νερό. Η επιδερμίδα σχηματίζεται από ένα μόνο στρώμα κυττάρων και καλύπτεται από μία κηρώδη ουσία, η οποία αποτελείται κατά τα 2/3 από ολεανικό οξύ και κατά το 1/3 από διάφορες άλλες ενώσεις, όπως αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, και αλδεΐδες. Επιπλέον η φλούδα, όπως και ο βότρυς, είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Οι ερυθρές ποικιλίες περιέχουν διπλάσια ποσότητα πολυφαινολών από αυτή των λευκών ποικιλιών. Μια ιδιαίτερη κατηγορία πολυφαινολών αποτελούν οι ανθοκυανες. Αυτές αποτελούν χρωστικές και προσδίδουν διαφορές αποχρώσεις στον καρπό και εντοπίζονται στην φλούδα, σε δύο ή τρία στρώματα κυττάρων κάτω από την επιδερμίδα - αν και σε ορισμένες εντοπίζονται και στη σάρκα.^[11]

3.4 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΣΑΡΚΑΣ

Η σάρκα αποτελεί περίπου τα 83,0 - 87,0% του ολικού βάρους της ράγας, αλλά πολλές φορές, ανάλογα με τις ποικιλίες, φτάνει μέχρι τα 90,0% περίπου. Μεγαλύτερη είναι η αναλογία του σαρκώματος στις ποικιλίες χωρίς γίγαρτα. Το κύριο συστατικό του σαρκώματος είναι ο χυμός του, δηλαδή το γλεύκος, αποτελούμενο κυρίως από ζυμώσιμα σάκκαρα και οργανικά οξέα.^[11]



Εικόνα 1 : Δομή του καρπού

4 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

- **Μοσχάτο Αμβούργου**

Το μοσχάτο Αμβούργου ξεχωρίζει από τις ερυθρωπές ρώγες του. Είναι μία από τις λίγες ποικιλίες που οινοποιούνται και παράλληλα καταναλώνονται ως επιτραπέζιες. Απαντάται στον αμπελώνα της κεντρικής Ελλάδας και ιδιαίτερα αυτόν του Τυρνάβου. Ωστόσο λόγω της χαμηλής οξύτητας και των μαλακών τανίνων του, το Μοσχάτου Αμβούργου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του για την παραγωγή μονοποικιλιακών οίνων.

- **Βοηδόματο**

Φυτεμένος διάσπαρτα στην Πελοπόννησο και σε όλη τη νησιωτική Ελλάδα, ο ερυθρός Βοϊδομάτης είναι πλούσιος σε χρώμα και σάκχαρα, αλλά όχι και σε οξύτητα.

- **Ασύρτικο**

Το ασύρτικο είναι μια σπάνια λευκή ποικιλία παγκόσμιας κλάσης και μια από τις σπουδαιότερες ποικιλίες που απαντώνται στη λεκάνη της Μεσογείου. Προέρχεται από τη

Σαντορίνη (ασύρτικο-Σαντορίνης), αλλά εξαπλώθηκε σε όλη την Ελλάδα και έγινε, από άποψη ποιότητας, μία από τις πιο σημαντικές γηγενείς ποικιλίες. Μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθήκες ζεστού και ξηρού κλίματος, διατηρώντας υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

- **Μοσχόμαυρο**

Το μοσχόμαυρο καλλιεργείται σε μικρή έκταση και μάλιστα μόνο στον αμπελώνα της κεντρικής και ΒΔ Ελλάδας. Κάθε καρποφόρα κληματίδα φέρνει 2 σταφύλια, μέτρια ως μεγάλα, 350-400 g, κυλινδροκωνικά, πυκνόραγα. Οι ράγες είναι μέσου μεγέθους, σφαιρικές, με φλοιό μέτρια παχύ, ανοικτού ερυθροιώδους χρωματισμού και σάρκα άχρωμη, μαλακή, γλυκιά, ελαφρά αρωματική, με 2-3 μέτρια γίγαρτα.

- **Vinsanto**

Το Vinsanto (Vin Santo=άγιο κρασί) είναι ένα επιδόρπιο κρασί. Ο τρύγος γίνεται γύρω στα μέσα Σεπτεμβρίου και αρχικά γίνεται λιάσιμο (έκθεση στον ήλιο) των σταφυλιών για μερικές ημέρες. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε απώλεια νερού και αύξηση της περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Το πάτημα των σταφυλιών γίνεται με μάγγανα. Ο μούστος που προκύπτει, οδηγείται σε ξύλινα βαρέλια, για να ακολουθήσει η διαδικασία της ζύμωσης για τουλάχιστον τέσσερις μήνες. Στην συνέχεια αφήνεται να ωριμάσει τουλάχιστον για δύο χρόνια μέσα σε δρύινα βαρέλια. Σύμφωνα με την νομοθεσία, τα σταφύλια πρέπει κατά να είναι τουλάχιστον κατά 51% της ποικιλίας Ασύρτικο, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό θα πρέπει να είναι σταφύλια των ποικιλιών Αηδάνι και Αθήρι.

- **Μαυροτράγανο**

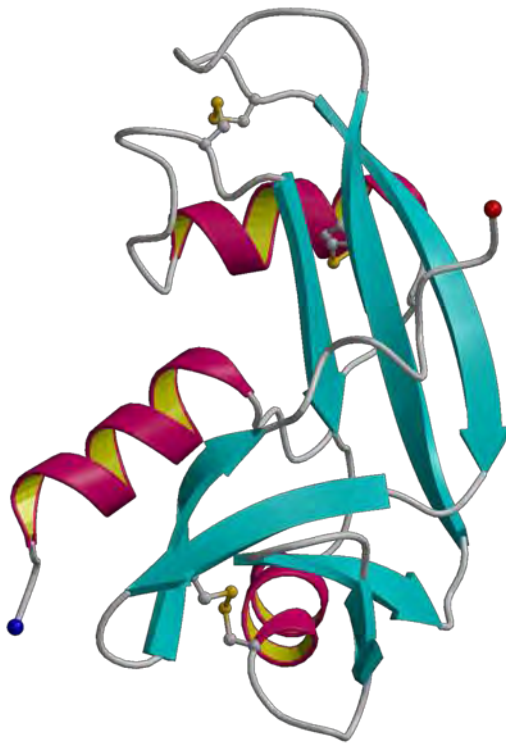
Μέχρι πριν από ελάχιστα χρόνια η ερυθρή ποικιλία με τις μαύρες και τραγανές ρώγες - χαρακτηριστικά από τα οποία παίρνει και το όνομά του το μαυροτράγανο- συμμετείχε σε γλυκά κρασιά της Σαντορίνης, ενώ παράλληλα κινδύνευε με εξαφάνιση. Σήμερα, έχει γίνει πλέον μια από τις πιο πολυσυζητημένες ποικιλίες για την παραγωγή ερυθρών κρασιών.

5 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Με τον όρο RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions) αναφέρονται οι ριβονουκλεάσες με διάφορες βιολογικές λειτουργίες πέρα από την συνήθη καταλυτική τους ενζυμική δράση.^[12] Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές μελέτες στην προσπάθεια αξιοποίησης των ριβονουκλεασών στην θεραπεία του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές από αυτές έχουν αντικαρκινική δράση ενώ άλλες προάγουν τη δημιουργία όγκων.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ριβονουκλεασών, που διαθέτουν αντικαρκινική δράση είναι η Βοεΐα σπερματική ριβονουκλεάση (BS-RNase) και η ογκονάση (ONC). Και οι δύο ανήκουν στην υπερικογένεια της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α (RNase A). Διαθέτουν κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων *in vivo* και *in vitro*, και αποτελούν σήμερα αντικείμενο μελέτης για τη δημιουργία αντικαρκινικών φαρμάκων.^[13-14] Η κυτταροτοξική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν συγκεκριμένες κασπάσες, οι οποίες οδηγούν τελικά στην απόπτωση του κυττάρου. Μετά την είσοδο στο κύτταρο, προκαλούν τη διάσπαση του tRNA και έτσι αναστέλλουν τη μετάφραση. Αυτή η αναστολή της μετάφρασης οδηγεί, κατ' επέκταση, στην αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών, και έμμεσα στην ενεργοποίηση των κασπασών, που τελικά οδηγούν στην απόπτωση του κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι η καταλυτική δραστηριότητα και η διμερής μορφή των πρωτεϊνών, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταροτοξική δράση αυτών των ενζύμων.^[15]

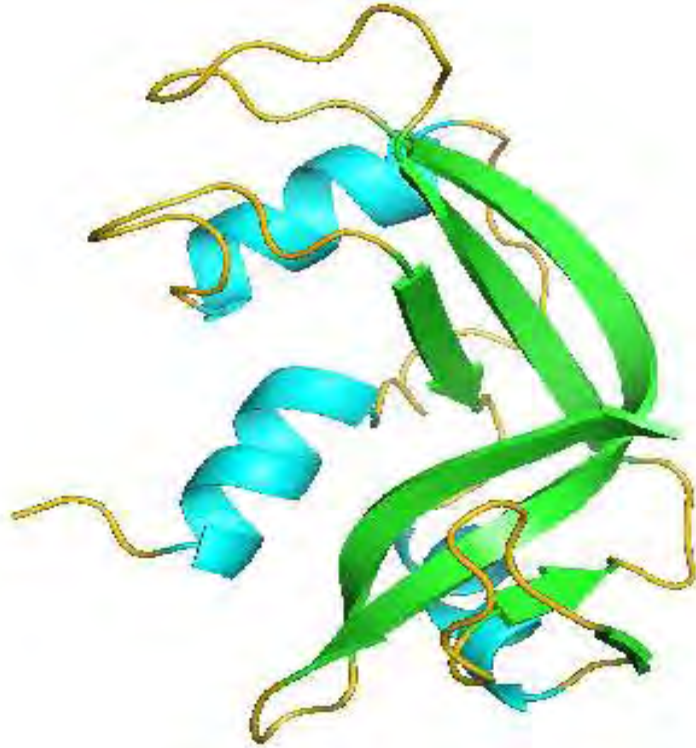
Αντιδιαμετρικά, η αγγειογενίνη αποτελεί αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ριβονουκλεάσης που προάγει τον καρκίνο. Αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη (Εικ: 2) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων, καθώς επάγει την αγγειογένεση ^[16]. Ουσιαστικά με την αγγειογένεση επιτυγχάνεται η τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Παράλληλα διευκολύνεται και η κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων. Η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Συνεπώς αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν την ενζυμική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την ριβονουκλεοτιδική δραστηριότητα του ενζύμου, ενισχύουν και την αγγειογενετική του δράση.^[17]



Εικόνα 2: Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης.

Συμπερασματικά οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον καρκίνο. Το σκεπτικό για την χρήση των ριβονουκλεασών χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η ιδιότητα τους ως κυτταροτοξικοί παράγοντες των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας κατηγορίας “φυσικών” φαρμάκων ενάντια διαφόρων τύπου καρκίνων, χωρίς τις παρενέργειες της τυποποιημένης χημειοθεραπείας ^[18]. Ενώ ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου.

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A), λόγω της μεγάλης αμινοξικής και δομικής ομολογίας που εμφανίζει με την αγγειογενίνη, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την δημιουργία αναστολέων. Ιδιαίτερα τα ενεργά τους κέντρα εμφανίζουν μέχρι και 100% ομολογία. Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης, αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς της αγγειογενίνης. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. ^[19]



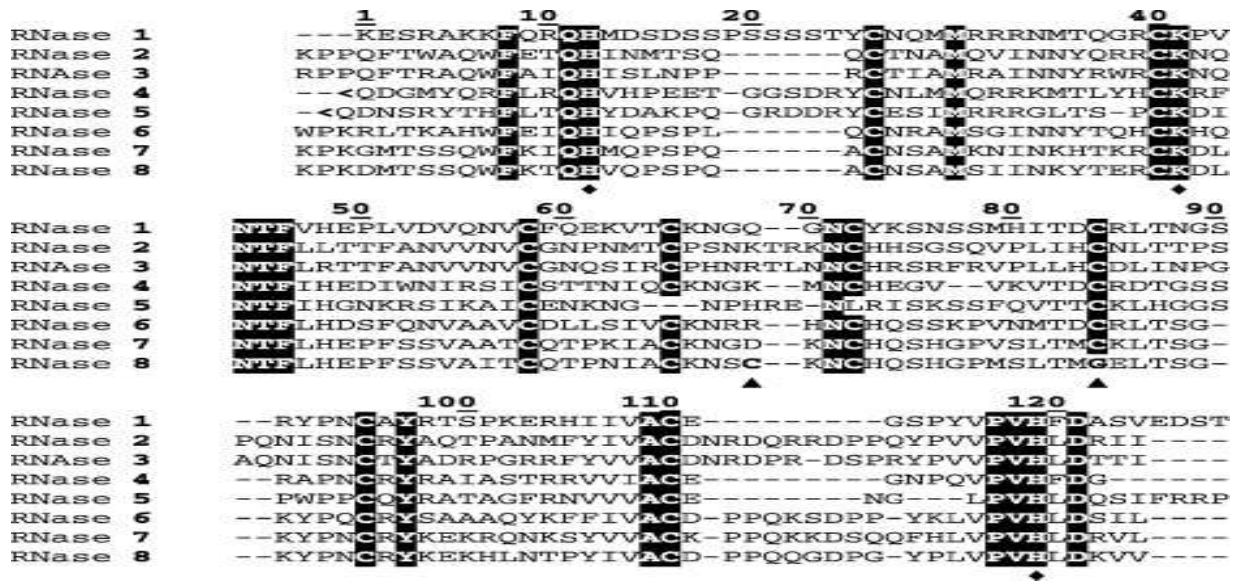
6 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ Α (RNASE A)

Η ριβονουκλέαση Α είναι μια παγκρεατική ενδοριβονουκλεάση, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις μονόκλωνες αλυσίδες του RNA και αφθονεί στον παγκρεατικό ιστό των μηρυκαστικών, καθώς και σε κάποια ερπετά. Συγκεκριμένα, στο πάγκρεας, αφθονεί η RNAση Α και σε μικρές συγκεντρώσεις η RNase Β, η οποία αποτελεί τη γλυκοζυλιωμένη μορφή της Α.^[20] Εξαιτίας της θερμοσταθερότητας, της αφθονίας του και της εύκολης απομόνωσης του, το συγκεκριμένο ένζυμο αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο για πολλούς διαφορετικούς τύπους πειραμάτων, τόσο για την ενζυμική του δράση, όσο και για βιοφυσικές μελέτες.^[21]

Η ριβονουκλέαση Α είναι, ίσως, το ένζυμο που έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί καλύτερα από όλα τα γνωστά ένζυμα των θηλαστικών, τον 20ο αιώνα. Το 1961 η ομάδα του Tony Mathias και του Bob Rabin, στο πανεπιστήμιο University College London, ανακάλυψαν τον πρώτο μηχανισμό κατάλυσης, μελετώντας το ένζυμο παγκρεατική ριβονουκλεάση (η δομή του ήταν ήδη γνωστή από το 1960).^[22]

Εικόνα 3 : Δομή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α

Κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1980, πολλές, φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ροβονουκλεάση Α, πρωτεΐνες από άλλους ιστούς, απομονώθηκαν και τα γονίδια τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Τελικά βρέθηκε να έχουν σημαντική ομολογία αλληλουχίας με την παγκρεατική RNAση Α. Αργότερα οι πρωτεΐνες αυτές ταξινομήθηκαν ως μέλη της υπερικογένειας της RNAσης Α. Σ' αυτές ανήκουν η αγγειογενίνη, η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (*ECP* ή *RNAση 3*), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (*EDN* ή *RNAση 2*) και αρκετές κυταροτοξίνες των ωκυττάρων του Βατράχου *R. Piriens* (ογκονάση, αμφινάση).^[23] Όλες οι πρωτεΐνες αυτής της υπερικογένειας βρέθηκε να διαθέτουν 6 με 8 κατάλοιπα κυστεΐνων, που σχηματίζουν διακριτούς δισουλφιδικούς δεσμούς, μεταξύ δύο καταλοίπων ιστιδίνης και ενός λυσίνης, με το χαρακτηριστικό μοτίβο (CKXXNTF). Ενώ παράλληλα έχουν χαρακτηριστική κοινή αλληλουχία σήματος.^[24]

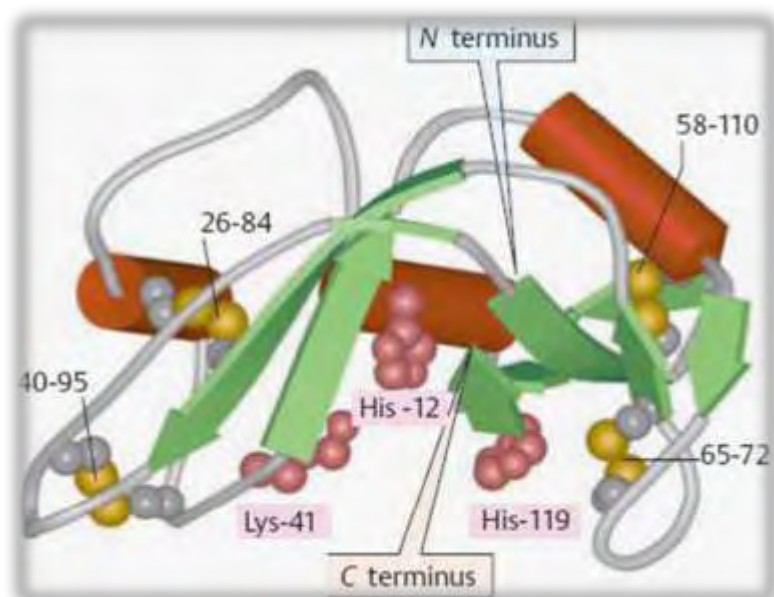


Εικόνα 4: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των 8 πρότυπων ριβονουκλεασών Α στον άνθρωπο. Το μαύρο μοτίβο υποδεικνύει τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα.

6.1 ΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη.

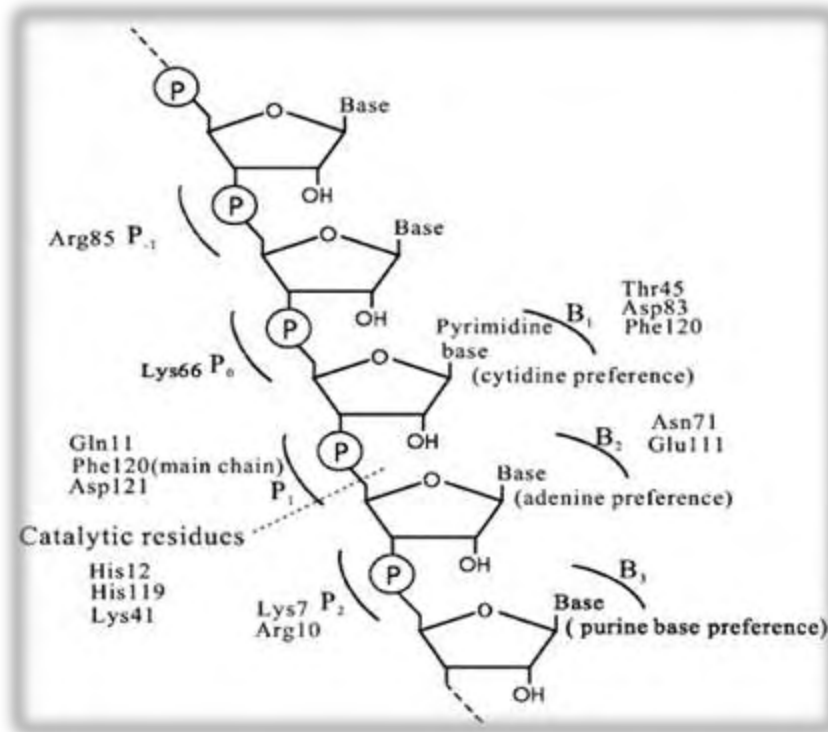
Το καταλυτικό κέντρο της RNase A σχηματίζεται από τρία βασικά κατάλοιπα (Εικ: 5) την His 12, την His 119 και τη Lys 41. Οι δύο ιστιδίνες είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ενώ η λυσίνη, λόγω του θετικού της φορτίου, αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Οποιαδήποτε χημική μεταβολή σε αυτά τα αμινοξέα έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό της δραστηριότητας του ενζύμου. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι αντικατάσταση των καταλοίπων His 12 και His 119 από κατάλοιπα Asp 12 ή Glu 12, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, αλλά και την αποσταθεροποίησή του, γεγονός που αποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο των δυο αυτών καταλοίπων στη λειτουργία της ενδονουκλεάσης.^[26]



Εικόνα 5: Το ενεργό κέντρο της ριβονουκλεάσης A

Ένα όχι πρωτεύον αλλά εξίσου σημαντικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου είναι η Thr 45. Το κατάλοιπο αυτό δε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική δράση του ενζύμου, αλλά έχει πολλαπλούς ρόλους τόσο στην ειδικότητα του ενζύμου για τα νουκλεοτίδια, όσο και για την αναδιοργάνωση του υποστρώματος. Πιο ειδικά, η Thr 45 έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μια κυτοσίνη ή ουρακίλη του συνδεδεμένου υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Αυτοί οι δεσμοί αυξάνουν την ειδικότητα της RNase A για κυτοσίνη παρά για ουρακίλη. Έτσι, η ειδικότητα του ενζύμου για poly(C) είναι μεγαλύτερη από ότι για poly(A), ενώ δεν έχει καθόλου ειδικότητα για poly(G).

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου δεν είναι οι μόνες που ευθύνονται για την πρόσδεση του υποστρώματος. Σε μη καταλυτικές υπομονάδες της RNase A, εντοπίζονται κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του υποστρώματος. Έτσι, εκτός από το υποκέντρο p_1 , που αποτελεί το ενεργό κέντρο, υπάρχουν δύο ακόμα υποκέντρα, το p_2 που περιλαμβάνει τα βασικά κατάλοιπα Lys 7 και Arg 10 και το p_0 που περιλαμβάνει την Lys 66 (Εικ: 6). Στο p_2 γίνεται η πρόσδεση των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής, ενώ στο p_0 προσδέονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του υποκέντρου p_2 είναι σημαντικές τόσο στην κατάλυση όσο και στη δραστηριότητα ενδονουκλεάσης, ενώ το υποκέντρο p_0 συνεισφέρει μόνο στην πρόσδεση του RNA.



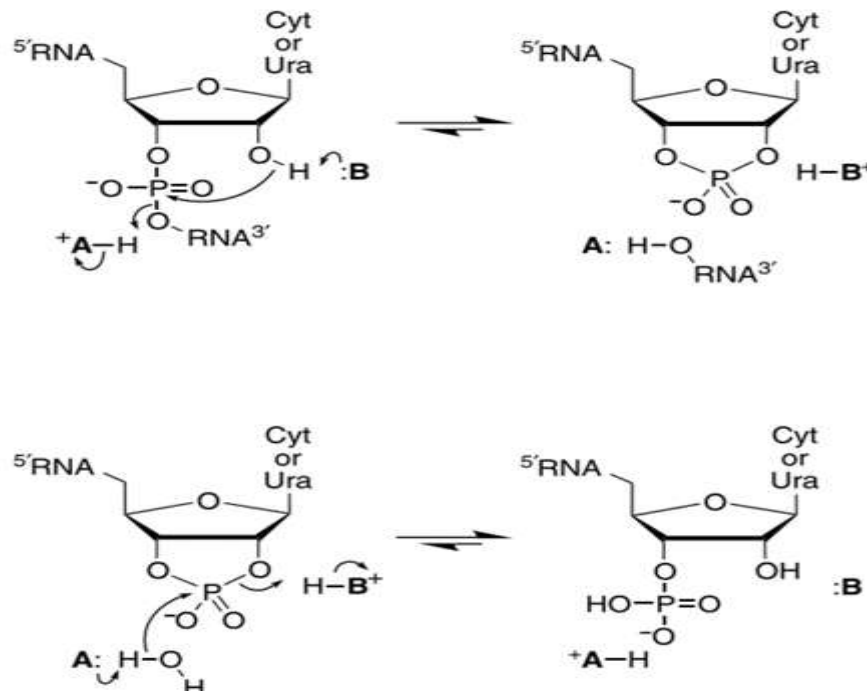
Εικόνα 6: Απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος

6.2 ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση (RNase A), με μοριακό βάρος 13.682kDa, όπως προαναφέρθηκε καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών σε μόρια RNA. Η διάσπαση πραγματοποιείται μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφορυλίωσης και μιας υδρόλυσης.

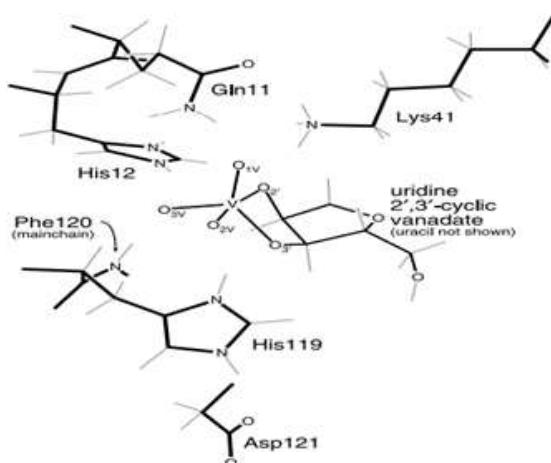
Η τρανσφωσφορυλίωση αποτελεί μια μη αντιστρεπτή διαδικασία, κατά την οποία πραγματοποιείται η διάσπαση του P-O5' και η μεταφορά του στην 3' πλευρά του γειτονικού καταλοίπου μιας πυριμιδίνης. Ένας κοινά αποδεκτός μηχανισμός κατάλυσης περιγράφεται στην Εικ: 8. Σε αυτό το μηχανισμό τα αμινοξικά κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι μια His12, μια His119 και μια Lys41. Η πλευρική αλυσίδα του ιμιδαζολίου μιας His12 αφαιρεί ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, αυξάνοντας έτσι τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα του

οξυγόνου. Παράλληλα η πρωτονιωμένη μορφή της His119 διοχετεύει το πρωτόνιο της στον 5'-O και ο 2'-O σχηματίζει δεσμό με τον P, ο οποίος στην συνέχεια σχηματίζει δεσμό με 5 άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από την θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41. Στην συνέχεια, όταν το πρωτόνιο της His119 μεταφερθεί πλήρως στο άτομο του 5'-O, ο δεσμός μεταξύ P και 5'-O διασπάται ενώ παράλληλα σχηματίζεται και το προϊόν 2'-3' κυκλικός φωσφοδιεστέρας.



Εικόνα 7 : Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την RNAση A

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η υδρόλυση του 2'-3' κυκλικού ενδιάμεσου, κατά την οποία, αυτή τη φορά, δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης η His119. Το τελικό προϊόν είναι ένας 3'-φωσφορικός νουκλεοζίτης.^[26] Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης θα ξεκινήσει μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση ^[27]



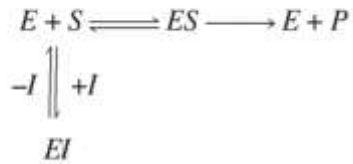
Εικόνα 8: Μηχανισμός κατάλυσης στο ενεργό κέντρο

6.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ (ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ - ΜΗ ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ)

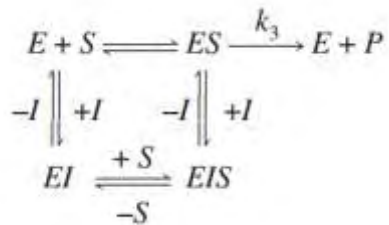
Η λειτουργία ενός ενζύμου έγκειται στην επιτάχυνση της αντιδράσεως την οποία καταλύει. Ωστόσο, η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα.

Ως αναστολείς (παρεμποδιστές, inhibitors) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν της ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης στο μόριο-ένζυμο. Διακρίνονται σε αντιστρεπτούς (reversible) και μη αντιστρεπτούς (irreversible) αναστολείς. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά του όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντιδράσεως παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντιδράσεως, και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος.

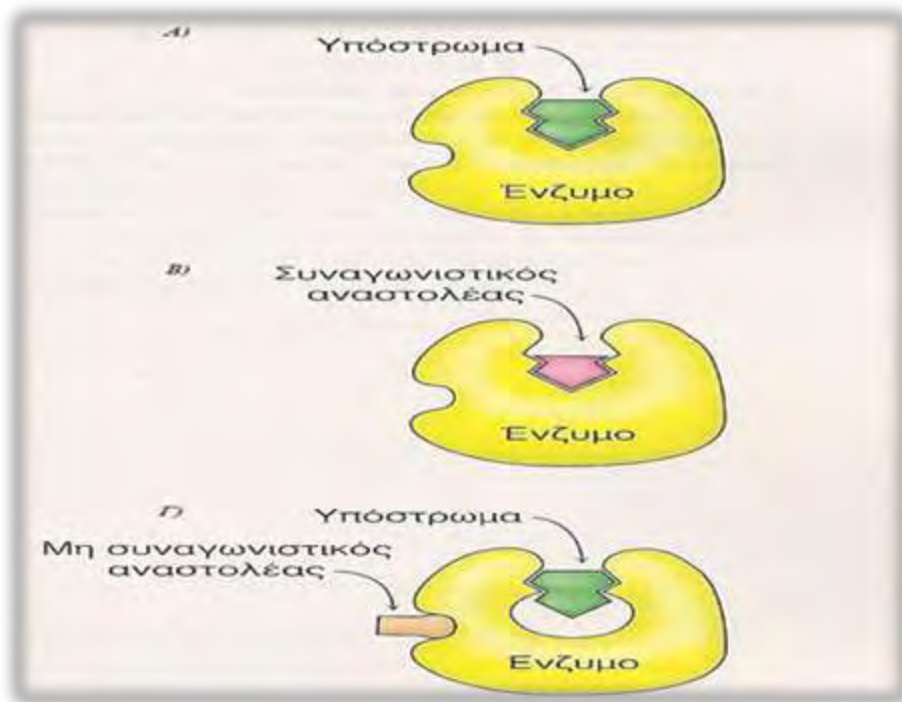
Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής όπως η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική. Όλα διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης. Η συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition) περιγράφεται από το εξής πρότυπο ισορροπίας:



Ο αναστολέας έχει δομή παρόμοια με εκείνη του υποστρώματος και δεσμεύεται στο ένζυμο στη θέση του υποστρώματος, δηλαδή συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για την ίδια θέση του ενζύμου. Η μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition) περιγράφεται από το εξής πρότυπο ισορροπίας:



Εδώ, αντίθετα, ο αναστολέας δεσμεύεται σε διαφορετική θέση στο ένζυμο, από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο. (Εικ: 9,Γ)



Εικόνα 9: Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, Γ) Μη συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα σε άλλη θέση και όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αλλάζει η δομή του ενζύμου και η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του είναι αδύνατη.

Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, επομένως η ταχύτητα αντίδρασης μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της (V_{max}). Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_m , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_m , που καλείται K_m^{app} είναι αριθμητικά ίση με:

$$K_m^{app} = K_m (1 + [I]/K_i),$$

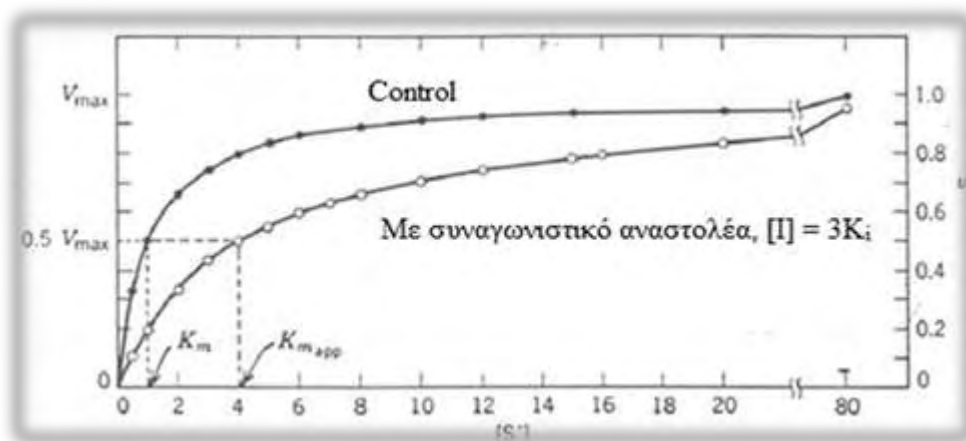
όπου και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου - αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_m^{app} (Εικ: 10). Αντίθετα, στην μη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η τιμή της V_{max} (μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης) ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} , ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_m (Εικ: 11). Η νέα μέγιστη ταχύτητα δίνεται από την σχέση:

$$V_{max}^{app} = V_{max} \cdot \frac{1}{1 + ([I]/K_i)}$$

Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.^[28]



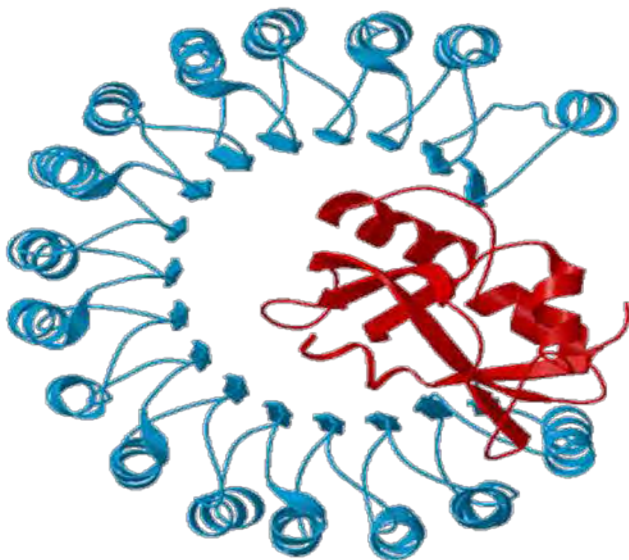
Εικόνα 10: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία συναγωνιστικού αναστολέα.



Εικόνα 11: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα.

6.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ RNASE A

Ένας από τους πιο σημαντικούς φυσικούς αναστολείς των RNAsών A, με ειδικότητα πρόσδεσης κυρίως στην αγγειογενίνη, είναι ο πλακουντικός ανθρώπινος αναστολέας ριβονουκλεασών (PRI-placental ribonuclease inhibitor). Ο αναστολέας αποτελεί μια πρωτεΐνη 50kDa, η οποία προστατεύει το κυτταροπλασματικό RNA από τυχόν παγκρεατικές ριβονουκλεάσες. Προσδένεται ισχυρά στην RNάση A και στην αγγειογενίνη με τιμή K_i $4,4 \times 10^{-14}$ και $6,7 \times 10^{-14}$, αντίστοιχα.^[29] Ωστόσο, σαν μόριο, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξειδωση. Κατ' επέκταση απαιτεί αναγωγικό περιβάλλον και αυτό τον καθιστά πρακτικά δύσκολο στο χειρισμό.



Εικόνα 12: Η δομή του συμπλόκου RI-RNase A

Ένας ακόμα πρωτεϊνικός αναστολέας, σχεδιασμένος ειδικά για την αναστολή της αγγειογενίνης, είναι ο cAb26-27. Αποτελεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στην ανθρώπινη αγγειογενίνη. Μελέτες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο αντίσωμα προκαλεί καταστολή ανάπτυξης ανθρώπινου καρκίνου του στήθους, σε αθυμικά ποντίκια.^[30]

Επίσης διάφορες έρευνες επικεντρώθηκαν σε απλά μονονουκλεοτίδια και δινουκλεοτίδια ή παράγωγα αυτών. Οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς που αναγνωρίστηκαν (pT-3'-p, pU-2'(3')-p, pA-3'-p, C-2'-p, U-2'-p) επιδεικνύουν χαμηλή σταθερά διάστασης στις τιμές βέλτιστου pH 6.6. Οι τιμές K_i εξαρτώνται άμεσα από το pH και την ιονική ισχύ, επομένως και σύγκριση μεταξύ των αναστολέων πραγματοποιείται μόνο στην περίπτωση που έχουμε ίδιες συνθήκες.

Στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μελετήθηκαν, επίσης, μονονουκλεοτίδια και δινουκλεοτίδια της 5'-πυροφωσφορικής αδενοσίνης ως αναστολείς.^[31-33] Η ανάπτυξη τους βασίστηκε στην παρατήρηση ότι το 5'-ADP (ppA, $K_i=1.2\mu\text{M}$) προσδένεται 67 φορές πιο ισχυρά στην ριβονουκλεάση από το 5'-AMP (pA). Οι τιμές των K_i των συμπλόκων βρέθηκαν ίσες με $0.24\mu\text{M}$ και $0.52\mu\text{M}$ αντίστοιχα.^[31-32]

Στην συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές της ριβονουκλεάσης A με τον ppA-3'-p και τον ppA-2'-p, στις οποίες βασίστηκε ο σχεδιασμός ενώσεων με ισχυρότερη πρόσδεση.^[31] Αργότερα δοκιμάστηκαν ο dUpp-A-3'-p(5'-φωσφο-2'-δεοξουριδίνη 3'-πυροφωσφορικός P'→5' εστέρας με 3'-φωσφορική αδενοσίνη) και ο αντίστοιχος εστέρας με ουριδίνη.^[32] Η συγγένεια του dUpp-A-3'-p και του U2'pp-A-3'-p με την ριβονουκλεάση ήταν δύο φορές μεγαλύτερη από αυτή της ppA-3'-p σε pH 5.9. Η καθοριστική συμβολή του pH στην πρόσδεση ευνοούσε μόνο την πρόσδεση του νουκλεοτιδίου 3'→5' και έτσι μόνο αυτό χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω βελτίωση. Μελέτες μοντελισμού του συμπλόκου ριβονουκλεάσης A - dUpp-A-3'-p υποδήλωνε ότι η επέκταση του αναστολέα κατά μία 5'-φώσφορική ομάδα θα δημιουργούσε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με την P1 υποπεριοχή. Η K_i του rdUpp-A-3'-p (27nM) όντως βρέθηκε αρκετά μικρότερη από αυτή του dUpp-A-3'-p.^[32-33]

Τέλος, έχει μελετηθεί μία σειρά νουκλεοζιτών (μία μονάδα που αποτελείται από μία βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο), οι οποίοι παρουσίαζαν μία αρκετά ικανοποιητική συναγωνιστική αναστολή της τάξης των μM (micromolar). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι τιμές της σταθεράς διάστασης K_i ήταν χαμηλότερες (επομένως ήταν ισχυρότερη η αναστολή) όταν ο αναστολέας είχε στο μόριο του έναν παρεμβαλλόμενο μεταξύ της βάσης και του σακχάρου τριαζολικό δακτύλιο, σε σχέση πάντα με τους αναστολείς που μελετήθηκαν και δεν είχαν στο μόριο τους τριαζολικό δακτύλιο. ^[34]

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων αμπέλου (*vitis vinifera*) στην αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου παγκρετικής ριβονουκλεάσης Α. Στο πείραμα προσεγγίστηκε όσο το δυνατό καλύτερα εκείνη η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50% (IC_{50}).

Απώτερος στόχος της συνολικής έρευνας είναι η ενδεχόμενη εύρεση νέων, φυσικών και όχι χημικά, συντιθέμενων μορίων βιο-ιατρικού ενδιαφέροντος, που πιθανώς βρίσκονται στα εκχυλίσματα της αμπέλου, και την αξιοποίησή τους στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει φυσικών ογκοκατασταλτικών φαρμάκων, λιγότερο τοξικών για τον ανθρώπινο οργανισμό.

7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

7.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1.1 ΥΛΙΚΑ

7.1.1.1 Αντιδραστήρια

- **Βοεΐα παγκρεατική ριβονουκλεάση A** (type X11A). Εταιρία *Sigma-Aldrich* (Athens, Greece).
- **Ribonucleic acid transfer baker's yeast**. Εταιρία *Sigma-Aldrich* (Athens, Greece).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα AcONa/AcOH**: Οξικό οξύ [CH₃COOH]/ οξικό νάτριο [C₂H₃Na₂], συγκέντρωσης 0,1 M και pH=6. Χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH και η ιοντική ισχύς. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα χρήσης, δηλαδή ως το διάλυμα στο οποίο διαλύεται το ένζυμο RNase A Εταιρία *Merck* (Athens, Greece).
- **Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer)**: Sodium Phosphate (0,2M NaH₂PO₄ / 0,2M Na₂HPO₄), συγκέντρωσης 50mM, σε τελικό όγκο 50ml και pH=7,4. Στο διάλυμα αντίδρασης διαλύεται και το υπόστρωμά (tRNA). Εταιρία *Merck* (Athens, Greece).
- **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution)**:
40mM Lanthanum Nitrate [La(NO₃)₃.6(H₂O)] (Εταιρία: *Sigma*)
6% Perchloric acid [HClO₄] (Εταιρία: *Fluka*), σε τελικό όγκο 50ml (αραίωση με ddH₂O).
- **Εκχυλίσματα**: σε μορφή σκόνης φυλάσσονται στους -20^o C.

7.1.1.2 Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός (*Orma, Italy*)
- Πεχάμετρο (*Metrohm 691, Switzerland*)
- Γωνιομετρική κεφαλή (*Hampton Research, U.S.A.*)
- Χρονόμετρο
- Κυψελίδα χαλαζία-οπτικής διαδρομής 1cm (*Hellma QS, Germany*)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (*Genesis 10 UV*)
- Συσκευή *vortex*

7.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α

7.2.1.1 Υπολογισμός συγκεντρώσεων του ενζύμου και του υποστρώματος

Οι συγκεντρώσεις της βοείας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α και του υποστρώματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, σύμφωνα με τον τύπο:

$$C=A / (\epsilon \cdot b) \quad \text{όπου } A : \text{απορρόφηση}$$

ϵ : συντελεστής απορρόφησης

και b : οπτική διαδρομή

Το ένζυμο φυλάσσεται σε μορφή σκόνης στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Παίρνουμε ελάχιστη ποσότητα σκόνης και προσθέτουμε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος AcONa/AcOH ($\text{pH}=6$). Στη συνέχεια η συγκέντρωση της ριβονουκλεάσης Α προσδιορίζεται σε μήκος κύματος 278 nm, χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{278}= 9800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.^[35] Αντίστοιχα το υπόστρωμα tRNA φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και η

συγκέντρωση του προσδιορίζεται επίσης φωτομετρικά, σε μήκος κύματος 260 nm, χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{260}=9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και θεωρώντας ότι κάθε μονάδα οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 1,42 μM .

7.2.1.2 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της ριβονουκλεάσης A

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί μέτρο έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η ειδική δραστηριότητα της ριβονουκλεάσης A προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Συγκεκριμένα, το μη υδρολυμένο tRNA κατακρημνίζεται παρουσία υπερχλωρικού οξέος και νιτρικού λανθανίου. Με αυτό τον τρόπο παραμένουν στο υπερκείμενο τα νουκλεοτίδια που προέρχονται από την υδρόλυση του tRNA από την RNase A και τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά στα 260nm (μήκος κύματος απορρόφησης του RNA).

7.2.1.3 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα έξης αντιδραστήρια: 0,2 M NaH_2PO_4 και 0,2 M Na_2HPO_4 με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος

(tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι : 2 μ M, 4 μ M , 5 μ M, 6 μ M και 7 μ M. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μ l, ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η RNase A έχει αραιωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (pH 5,5-6) , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από ένα λεπτό (1 min) αναμιγνύοντας τα 300 μ l του διαλύματος αντίδρασης με 300 μ l διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 1 min αφού έχει προστεθεί η RNase A , σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 14.500 στροφές (rpm) για 15 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 580 μ l από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm.

7.2.1.4 Προσδιορισμός IC_{50} εκχυλισμάτων

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA. Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι η 7 μ M. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με αυτή για τον προσδιορισμό της K_m με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα εκχυλίσματος διαφορετικής συγκέντρωσης.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}\times\text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης του tRNA. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

7.2.1.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και IC_{50}

- Υπολογισμός K_m

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν (0, 2, 4, 5, 6, 7 μM). Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Grafit [Leatherbarrow RJ (1998) GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK.] προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (v , καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

$$v(s^{-1}) = \frac{\text{Slope}(min^{-1}cm^{-1})}{\epsilon(M^{-1}cm^{-1})60(sec)[Rnase](M)}$$

όπου,

Slope: η κλίση της ευθείας

ϵ : συντελεστής απορρόφησης

λ : μήκος κύματος (278 nm)

[RNase] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της K_m και της V_{max} . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις (σ^2) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών K_m και V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Το πρόγραμμα *GRAFIT* χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα

το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της K_m και V_{max} της RNase A.

Οι τιμές των K_m των ενζύμων ποικίλουν. Για τα περισσότερα ένζυμα, η K_m έχει τιμές μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} M. Η τιμή K_m για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η K_m έχει την εξής έννοια: είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα.

- Υπολογισμός IC_{50}

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Εφ' όσον η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\text{Sp. activity} = \frac{\text{OD-Blank}}{516,4 \cdot 0,006} \quad \mu\text{moles CMP} / \text{min} \cdot \text{nmoles ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,006: τα nmoles του ενζύμου στην αντίδραση

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{s.a.}_{\text{control}} - \text{s.a.}_i}{\text{s.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου: $\text{s.a.}_{\text{control}}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a.i : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή IC_{50} υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s}$$

όπου: s: η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος y μειώνεται όσο η x αυξάνει

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα %αναστολή=f([I]). Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

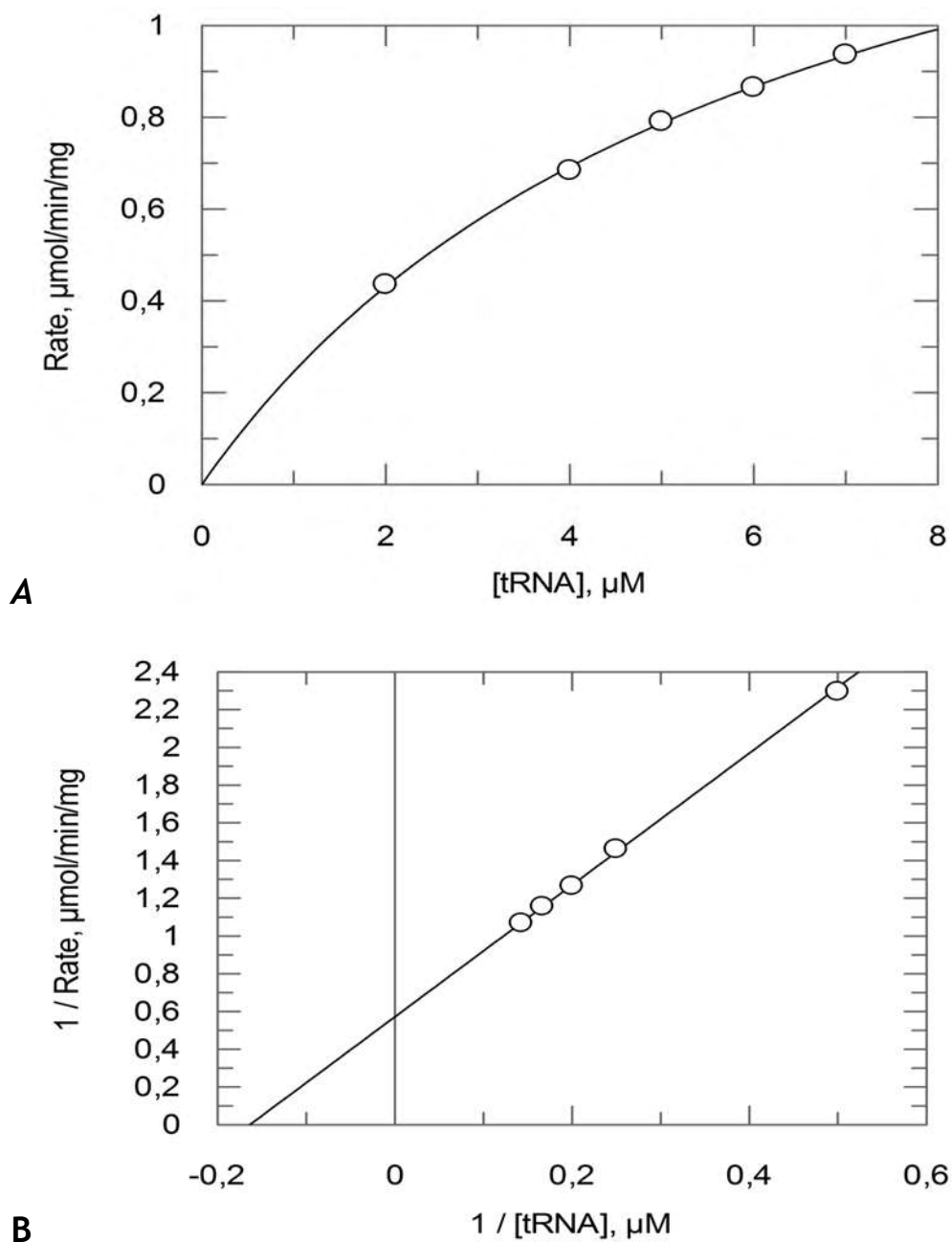
$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) K_i$$

Όπου [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος.

* Να σημειωθεί ότι τα πειράματα πραγματοποιούνται υπό άσηπτες συνθήκες και η συντήρηση των δειγμάτων, του ενζύμου κ του υποστρώματος γίνεται πάντα σε πάγο.

7.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 6,31 \pm 0.29 \mu M$, και $V_{max} = 1.6 \pm 0.05 \text{ mol CMP/mg/min}$.

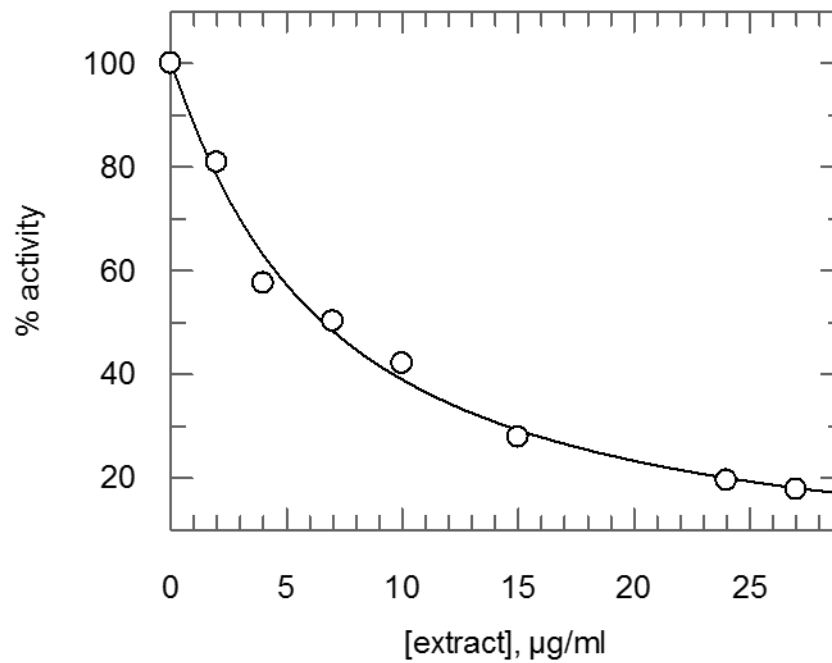


Εικόνα 13: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της RNaseA σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 μM). Α. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Β. Το

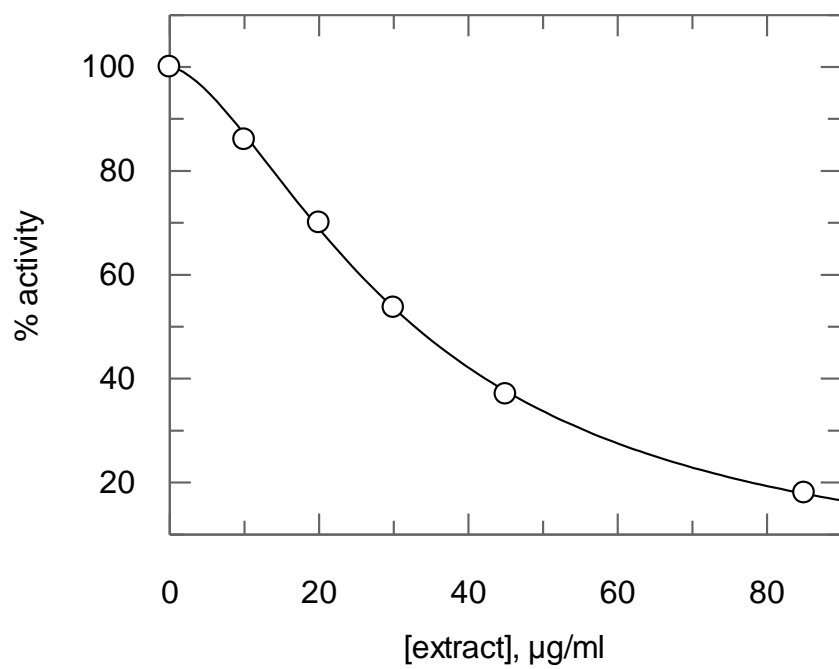
αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

7.2.2.1 Τελικά αποτελέσματα της IC_{50} των εκχυλισμάτων

7.2.2.1.1 Εκχύλισμα 1 (Μοσχάτο Αμβούργου, Βότρυ)



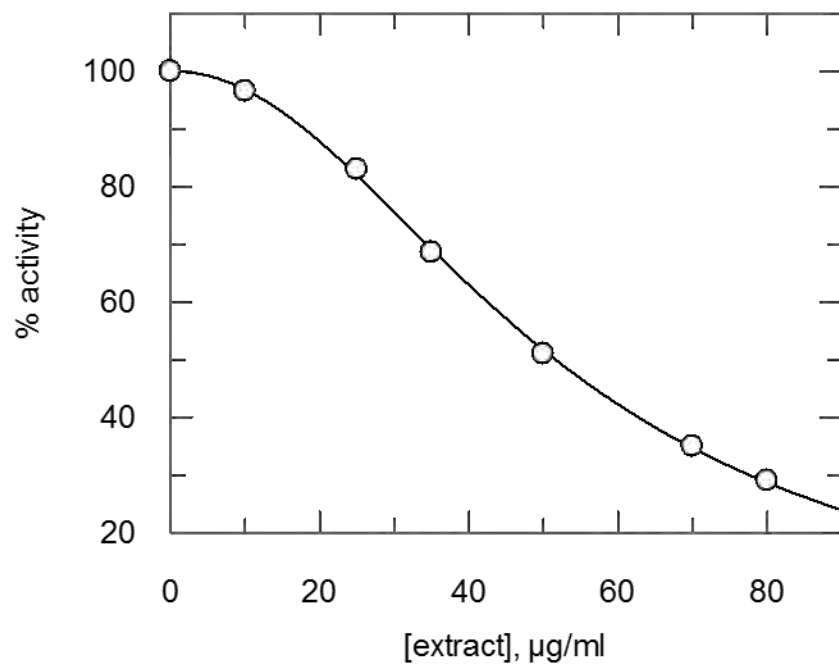
$$IC_{50} = 6.57 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$$



7.2.2.1.2 Εκκύλισμα 2 (Βοηδόματο Σαντορίνης, Βότρυ 2006)

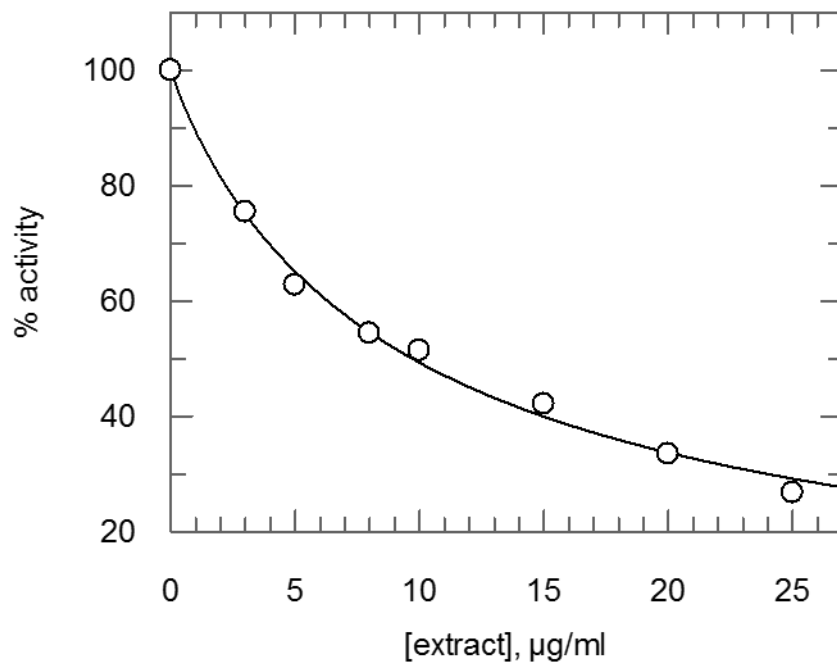
$IC_{50} = 32.83 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$

7.2.2.1.3 Εκκύλισμα 3 (Ασύρτικο Σαντορίνη 2006)



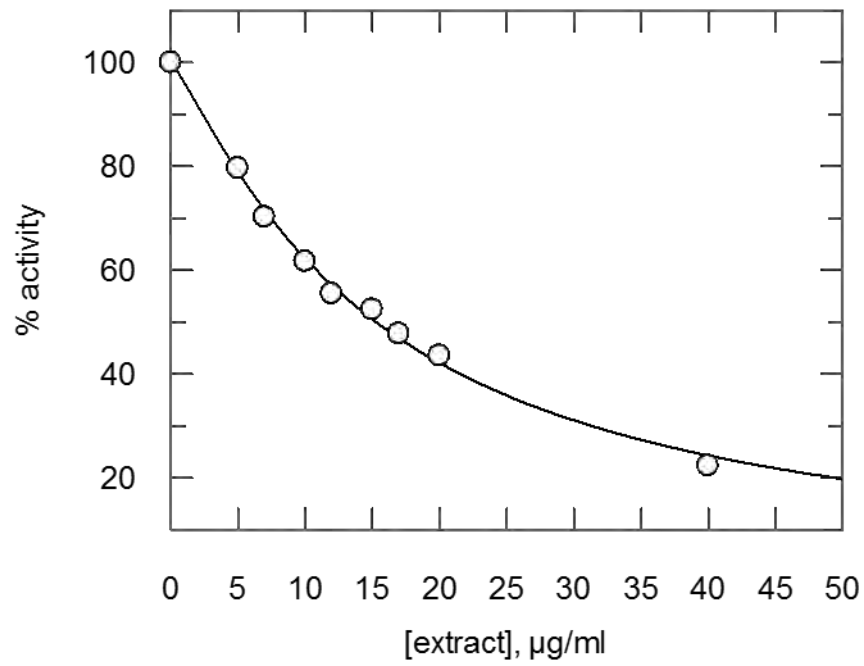
$$IC_{50} = 51.63 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$$

7.2.2.1.4 Εκχύλισμα 4 (Vinsanto)



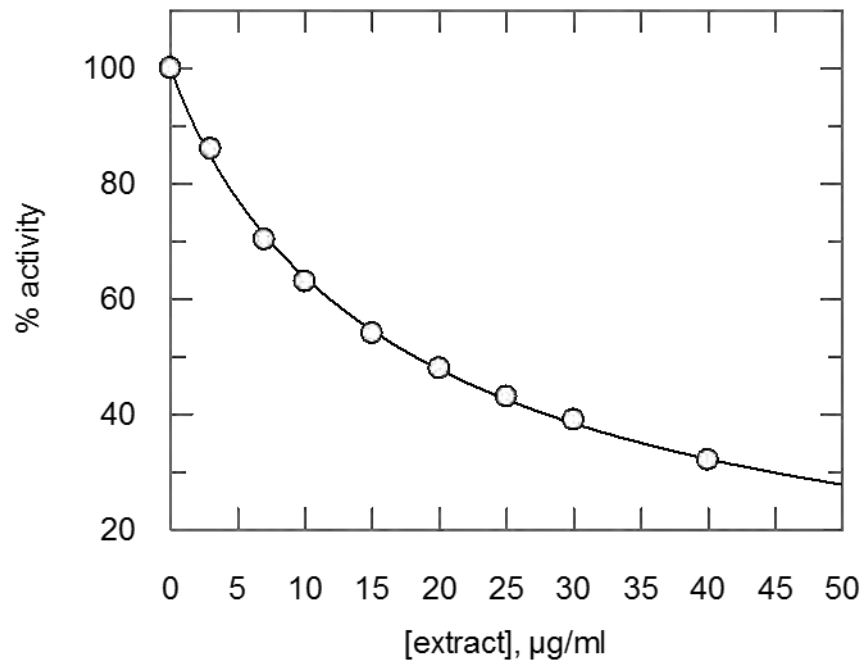
$$IC_{50} = 9.70 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$$

7.2.2.1.5 Εκχύλισμα 5 (Μοσχόμαυρο, Βότρυ 2011)



$IC_{50} = 15.27 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$

7.2.2.1.6 Εκχύλισμα 6 (Μαυροτράγανο)



$IC_{50} = 18.16 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε έξι πολυφαινολικά εκχυλίσματα σταφυλιού από διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικά μέρη του καρπού, για την μελέτη της αναστολής που μπορεί να επιφέρουν στην παγκρεατική ριβονουκλεάση Α. Και τα έξι εκχυλίσματα σταφυλιού που εξετάστηκαν οδήγησαν σε σημαντική μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι $K_m = 6,31 \pm 0.29 \mu\text{M}$, και $V_{max} = 1.6 \pm 0.05 \text{ mol CMP}/(\text{mg}/\text{min})$, ενώ οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν 50% αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας (IC_{50}) βρέθηκαν:

Εκχύλισμα 1 (*Μοσχάτο Αμβούργου, Βότρυ*): $IC_{50} = 6.57 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$

Εκχύλισμα 2 (*Βοηδόματο Σαντορίνης, Βότρυ 2006*): $IC_{50} = 32.83 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$

Εκχύλισμα 3 (*Ασύρτικο Σαντορίνη 2006*): $IC_{50} = 51.63 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mL}$

Εκχύλισμα 4 (*Vinsanto*): $IC_{50} = 9.70 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$

Εκχύλισμα 5 (*Μοσχόμαυρο, Βότρυ 2011*): $IC_{50} = 15.27 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$

Εκχύλισμα 6 (*Μαυροτράγανο*): $IC_{50} = 18.16 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$

Μεταξύ των εκχυλισμάτων μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα φαίνεται να παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα από τις ποικιλίες *Μοσχάτο Αμβούργου, Βότρυ* και *Vinsanto*, καθώς παρουσιάζουν τις μικρότερες τιμές IC_{50} , σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ποικιλίες σταφυλιού. Επιπλέον, σε προηγούμενη εργασία που εκπονήθηκε στο εργαστήριό μας, όπου μελετήθηκαν τέσσερα εκχυλίσματα αμπέλου της ποικιλίας ασύρτικου, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές IC_{50} είναι και στην περίπτωση αυτή της ίδιας τάξης μεγέθους, γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι τα διάφορα αυτά εκχυλίσματα, στο σύνολό τους, παρουσιάζουν μία αρκετά ικανοποιητική ικανότητα μείωσης της δραστηριότητας της RNase A.. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού των εκχυλισμάτων με κρυσταλλογραφικές μελέτες και κυτταρικές μελέτες για την διαπίστωση της *in vivo* αποτελεσματικότητάς του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Hugh Johnson's, *Modern Encyclopedia of Wine 4th edition*, Simon&Schuster, 1998
- [2] Ronald s. Jackson, *Wine Science, third edition*, 2008, 1-19
- [3] Σουφλερός Ε, *Οινολογία: Επιστήμη και τεχνογνωσία, 2ος τόμος*, εκδοτική Θεσσαλονίκη, 2000 [4] Lorigeril m, salen P Paillard f, Laporte F, Boucher F, Leiris J, *Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary health disease*, Cardiovascular Research, 2002, 54: 503-515
- [5] umm.edu/health/medical/altmed/herb/grape-seed
- [6] G.K. Jayaprakasha, Tamil Selvi, K.K sakariah, *Antibacterial and antioxidant activities or grape (Vitis vinifera) seed extracts*, Human Resource Development, Central Food Technological Research Institute, Mysore-570 013, 2003
- [7] Nilgün Göktürk Baydara, Gülcan Özkanb, Osman Sağdıçc, *Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts*, 2004
- [8] Zhang Y, Shi H, Wang W, Ke Z, Xu P, Zhong Z, Li X, Wang S, *Antithrombotic effect of grape seed proanthocyanidins extract in a rat model of deep vein thrombosis*, 2011
- [9] Armentia A, *Adverse reactions to wine: think outside the bottle*, Curr Opin Allergy Clin Immunol, Review, 2008
- [10] Σταγκος Δ. *Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (Vitis vinifera)*, διδακτορική διατριβή

- [11] Ραυτοπούλου Χ. *Η παραγωγική διαδικασία οινοποίησης στον Ν. Αττικής*,
διπλωματική διατριβή
- [12] D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991). *Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily*. Trends Biochem Sci, 16(3), 104-106.
- [13] Benito A., Ribo M., Vilanova N., *On the track of antitumor ribonucleases*, Mol. Biosyst 1: 294-302, 2005
- [14] Ulrich Arnold, Renate Ulrich-Hofmann, *Natural and engineered ribonucleases as a potential cancer therapeutics*, 2006
- [15] Cafaro, V., Bracale, A., Formiggini, F., Notomista, E., D'Alessio, G. & Di Donato, A. *Protein engineering of ribonucleases*, Biochimie, 1998, 80, 905-909
- [16] Fett, J. W., Bethune, J. L et al., *Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane*. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 146(3), 1122-1131
- [17] Bond, M. D. & Vallee, B. L. *Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis*, Biochemistry, 1990, 29(13): 3341-3349.
- [18] Leland, Schultz et al. 1998)(Leland, P. A., Schultz L. W. Kim B.M., Raines R.T., *Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(18): 10407-10412
- [19] Leonidas, D. D., Chavali, G. B. et al. *High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors.*, Protein Sci, 2003, 12(11), 2559-2574
- [20] Matthias Gautschi, Jaap J. Beintema, *Selection Against Glycosylation in Ruminant Pancreatic Ribonucleases by Replacements in the Ancestral Carbohydrate Attachment Site*, Biochem Genet, 2008, 46 (7-8) : 446-450

- [21] Marshall GR , Feng JA , Kuster DJ, *Back to the future: ribonuclease A*, Biopolymers, 2008, 90(3): 259-77
- [22] Claudi M. Cuchillo, M. Victòria Nogués, Ronald T. Raines, *Bovine Pancreatic Ribonuclease: 50 Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism*, Biochemistry, 2011, 50(37): 7835-7841.
- [23] W. Ardelt, K. Shogen, Z. Darzynkiewicz, *Onconase and Amphinase, the Antitumor Ribonucleases from Rana pipiens Oocytes*, Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(3): 215-225
- [24] Cho, S., Beintema, J. J., Zhang, J, *The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories Genomics* , 2005, 85 208-220 C
- [25] James E. Thompson and Ronald T. Raines, *Value of General Acid-Base Catalysis to Ribonuclease A*, Department of Biochemistry University of Wisconsin-Madison, 1994, 53706-0569
- [26] R.T. Raines, Active Site of Ribonuclease A, Department of Biochemistry and Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, 433 Babcock Drive, Madison, Wisconsin 53706-1544, USA, 2004, pg. 22-24
- [27] Stryer, L., *Biochemistry*, 3th ed., 1997, W.H. Freeman
- [28] Κλώνης Ιωάννης, Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Κεφ:2, pg. 25-28, 2010, Πανεπιστημιακες εκδοσεις Κρητης
- [29] Vincentini A, Stone SR, Hofsteenge J: *Purification and characterization of truncated ribonuclease inhibitor*, Friedrich Miescher-Institut, Basel, Switzerland, 275(Pt 2): 541-543.
- [30] Brittan L. Pasloske, *Ribonuclease Inhibitors*, Nuclease Methods and Protocols Methods in Molecular Biology™ Volume 160, 2001, pp 105-111

[31] Leonidas DD, Vicky G. Tsirkone, Kyriaki Dossi, Christina Drakou, Spyros E. Zographos, Maria Kontou,b and Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation: *Inhibitor design for ribonuclease A: the binding of two 5'-phosphate uridine analogues*, Greece, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 1997.

[32] Leonidas DD, Shapiro R, Irons LI, Russo N, Acharya KR, *Toward rational design of ribonuclease inhibitors: high-resolution crystal structure of a ribonuclease A complex with a potent 3',5'-pyrophosphate-linked dinucleotide inhibitor* Biochemistry, 10;38(32):10287-97, 1999.

[33] Russo N and Shapiro R: *Potent inhibition of mammalian ribonucleases by 3',5'-pyrophosphate-linked nucleotides*. J Biol Chem 274:14902-14908, 1999.

[34] Parmenopoulou V., Chatzileontiadou DSM, Manta S, Bougiatioti S, Maragozidis P, Gkaragkouni ND., Kaffesaki E, Kantsadi AL., Skamnaki VT, Zographos SE, Zounpoulakis P, Balatsos NAA, Komiotis D. and Leonidas DD. (2012). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 7184-7193.

[35] Sela, M. and C. B. Anfinsen, *Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease*, Biochim Biophys Acta 24(2): 229-235.