

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

« ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ –
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ »



*Αποτίμηση της επίδρασης τριάζολο-νουκλεοζιτών της ριβόζης στην
ενεργότητα και τη δομή της ριβονουκλεάσης Α.*

Καρούλιας Στυλιανός – Ζαφείριος

Λάρισα, 2012

Αποτίμηση της επίδρασης τριάζολο-νουκλεοζιτών της ριβόζης στην ενεργότητα και τη δομή της ριβονουκλεάσης A.

Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Δημήτριος Κομώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη, τη συνεργασία και τη συνεχή βοήθεια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημήτριο για τις πολύτιμες συμβουλές, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και συζητήσεις, την καθοδήγηση, την ανεκτίμητη βοήθεια και τον πολύτιμο χρόνο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την συνεχή καθοδήγηση, την πολύ σημαντική βοήθεια, τις εύστοχες συμβουλές και παρατηρήσεις και την άριστη συνεργασία. Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την συνολική στήριξη και βοήθεια σε όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Μαραγκοζίδη για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθεια και την υποψήφια διδάκτορα Νατάσα Καντσάδη για την υποστήριξη και τη βοήθεια καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας για τη συνεργασία και την αλληλοβοήθεια. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βύρων Γοργογιέτα για την παροχή στέγης και συμπαράστασης και την αδερφή μου Ζωή Καρούλια για την πολύτιμη στήριξη.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract	6
Εισαγωγή.....	7
Η ταξινόμηση των Ριβονουκλεασών	7
Η ριβονουκλεάση Α	10
Το καταλυτικό κέντρο	13
Ο καταλυτικός μηχανισμός.....	14
Ενζυμική Αναστολή	16
Η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή είναι κινητικά διακριτές	18
Καρκίνος.....	21
Καρκίνος και Ριβονουκλεάσες.....	23
Οι Νουκλεοζίτες	25
Οι νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	25
Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών	27
Υλικά και Μέθοδοι	30
Υλικά	30
Ένζυμο.....	30
Νουκλεοτίδια και συνθετικό νουκλεοσίδιο	31
Διαλύματα της πειραματικής διαδικασίας.....	32
Ρυθμιστικό διάλυμα AcONa/AcOH.....	32
Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer)	32
Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (Stop solution)	33
Φασματοφωτομέτρηση.....	33
Μέθοδοι.....	34
Μέτρηση Συγκεντρώσεων	34
Διαδικασία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της RNase A απουσία και παρουσία αναστολέα.....	34
Πρότυπη Καμπύλη tRNA	34
Χρονοκαμπύλη.....	35
Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis Menten	35
Πειραματική διαδικασία.....	37
Αποτελέσματα	38
Υπολογισμός της K_i	39
Κινητική μελέτη με αναστολέα 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωροουρακίλη.....	41
Κινητική μελέτη με αναστολέα 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη.....	45
Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	49

Περίληψη

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος γενικότερου ερευνητικού προγράμματος που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο το σχεδιασμό και αποτίμηση νέων νουκλεοτιδικών αναστολέων ως εν δυνάμει αντικαρκινικών φαρμάκων έναντι διαφόρων μελών της υπερικογένειας της ριβονουκλεάσης Α. Τα πειράματα αρχικά διεξάγονται στην ριβονουκλεάση Α το βασικό ένζυμο της υπερικογένειας των ριβονουκλεασών μιας και το μοτίβο του καταλυτικού της κέντρου διατηρείται στην πλειονότητα των ριβονουκλεασών, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για τη μελέτη όλων των ομόλογων πρωτεϊνών. Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση δύο τροποποιημένων νουκλεοζιτών (1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωροουρακίλη και 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη) στην ενζυμική δραστηριότητα της ριβονουκλεάσης Α. Οι ενώσεις αυτές δείχθηκε πως είναι συναγωνιστικοί αναστολείς ως προς το υπόστρωμα (tRNA) με σταθερές αναστολής (K_i) 94.8 μM και 32,5 μM αντίστοιχα.

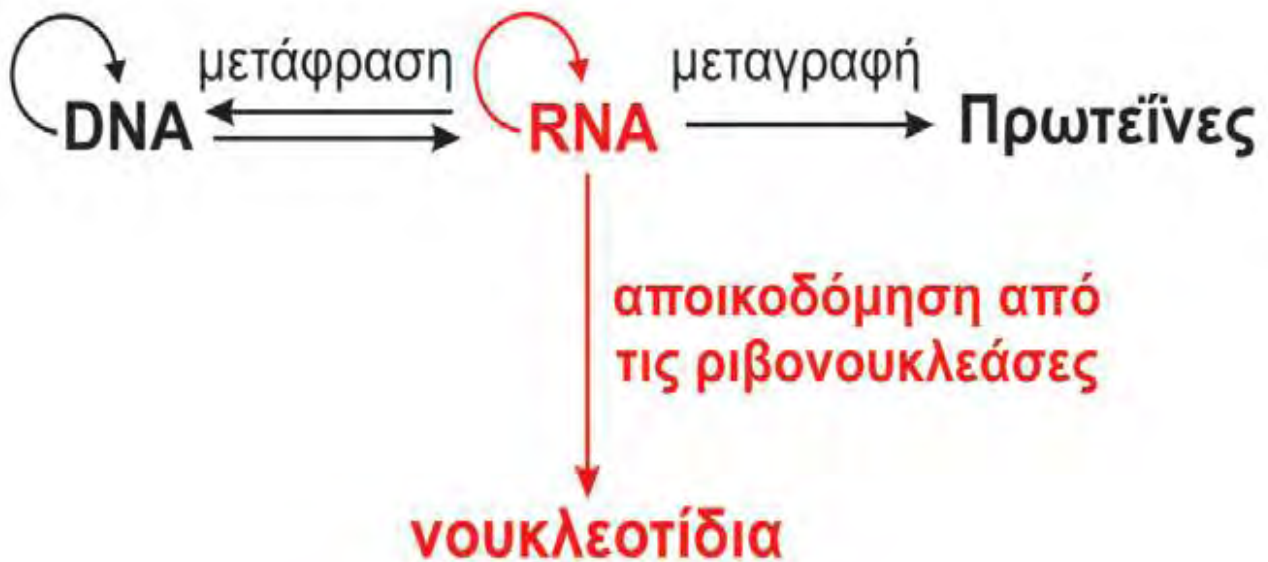
Abstract

The present work is part of the general research program of the Laboratory of Structural and Functional Biochemistry for the design and assessment of new nucleotide based inhibitors as potential anticancer drugs targeting several members of the pancreatic Ribonuclease A superfamily. Experiments are initially performed with Ribonuclease A, the parental enzyme of this superfamily since the active site is conserved amongst the members of the RNase A superfamily. Thus, in the present study we have studied two modified nucleosides (1-[1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-ribofuranosyl]-5-chlorouracil and 1-[1,2,3-triazol-4-yl]β-D-ribofuranosyl]-5fluorouracil) by kinetic experiments. Both compounds were found to be competitive inhibitors with respect of the substrate (tRNA) with K_i values of 94.8 μM and 32.5 μM , respectively.

Εισαγωγή

Η ταξινόμηση των Ριβονουκλεασών

Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, που παρατηρείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, είναι η ροή της γενετικής πληροφορίας (Εικόνα 1). Η βιολογική πληροφορία είναι αποθηκευμένη στο DNA και από εκεί γίνεται η μεταφορά της σε πρωτεΐνες με τη μεσολάβηση του RNA. Η ροή της γενετικής πληροφορίας μέσω της σύνθεσης ή της αποικοδόμησης του DNA και του RNA ελέγχεται από δύο κατηγορίες ενζύμων. Τις πολυμεράσες και τις νουκλεάσες, οι οποίες διασπούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων. Ορισμένες νουκλεάσες δρουν μόνο στο RNA (ριβονουκλεάσες, RNάσες), ενώ άλλες διασπούν μόνο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του DNA (δεοξυριβονουκλεάσες). Μια τρίτη κατηγορία νουκλεασών δεν παρουσιάζει ειδίκευση και μπορεί να δρα τόσο σε RNA όσο και σε DNA. Το γεγονός ότι όλοι οι οργανισμοί φαίνεται να διαθέτουν RNάσες διαφορετικών οικογενειών/κατηγοριών υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση του RNA είναι μια πολύ σημαντική αλλά και παλιά, στην πορεία της εξέλιξης, διεργασία. Οι RNάσες πέρα από την αποικοδόμηση του μη ωφέλιμου RNA των κυττάρων διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο και στην ωρίμανση των μορίων RNA. Ταυτόχρονα, η αποικοδόμηση του RNA από τις RNάσες αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού ενάντια σε RNA ιούς.



Εικόνα 1: Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας και η εμπλοκή των ριβονουκλεασών σε αυτό.

Οι νουκλεάσες μπορούν να θεωρηθούν ως μοριακά «ψαλίδια», τα οποία διασπών φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των σακχάρων και των φωσφορικών αλάτων του DNA ή του RNA. Περιέχουν συντηρημένα ελάχιστα μοτίβα, τα οποία αποτελούνται συνήθως από όξινα και βασικά αμινοξέα, που διαμορφώνουν το ενεργό κέντρο. Αυτά τα αμινοξέα των ενεργών κέντρων σε ορισμένες νουκλεάσες συντονίζονται καταλυτικά από δισθενή κατιόντα, όπως το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το μαγγάνιο ή ο ψευδάργυρος, που δρουν ως συνένζυμα. Εντούτοις, οι απαιτήσεις για την διάσπαση, όπως επίσης οι τύποι και οι αριθμοί των μετάλλων, είναι πολύ περίπλοκες και δεν είναι κοινές μεταξύ των νουκλεασών. Φαίνεται ότι ο σημαντικότερος ρόλος των μετάλλων είναι να σταθεροποιούν τα ενδιάμεσα μόρια, διευκολύνοντας με αυτό το τρόπο τις αντιδράσεις διάσπασης.

Μια δεύτερη διάκριση των νουκλεασών γίνεται με βάση τη θέση διάσπασης του RNA (Εικόνα 2). Οι ενδονουκλεάσες διασπών δεσμούς στο εσωτερικό των μορίων RNA ή DNA δημιουργώντας ξεχωριστά, μικρότερα τμήματα πολυνουκλεοτιδίων. Ορισμένες DNάσες κόβουν και τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA στο σημείο-στόχο, ενώ άλλες κόβουν μόνο τη μία από τις δύο αλυσίδες. Οι εξωνουκλεάσες αφαιρούν νουκλεοτίδια, ένα προς ένα, από το άκρο του μορίου DNA ή RNA απελευθερώνοντας μονονουκλεοτίδια. Το υπόστρωμά τους είναι πάντοτε μονόκλωνες αλυσίδες νουκλεϊκών

οξέων. Κάθε εξωνουκλεάση προχωρά προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση, δηλαδή ξεκινά είτε από το 5' άκρο είτε από το 3' άκρο και συνεχίζει προς το άλλο άκρο, επιτελώντας το «ψαλίδισμα» των άκρων.

Μια τρίτη διάκριση στην ταξινόμηση των νουκλεασών γίνεται εξελικτικά, έχοντας ως κεντρικό κριτήριο ταξινόμησης τις υπεροικογένειες πρωτεϊνών και όχι τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Μια προσπάθεια τέτοιας ταξινόμησης πραγματοποιήθηκε από τους L.Aravind & E.V.Koonin (Aravind and Koonin 2001). Στην διάκριση αυτή δεν ελήφθησαν υπόψη οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η τελική ταξινόμηση συμφωνεί με τις χημικές και καταλυτικές ιδιότητες. Τα μέλη κάθε υπεροικογένειας εμφανίζουν τμήματα συντηρημένων αλληλουχιών και κοινό μοτίβο αναδίπλωσης του καταλυτικού τους κέντρου. Οι υπεροικογένειες υποδιαιρούνται σε οικογένειες και αυτές με τη σειρά τους σε υποοικογένειες. Με βάση τους κανόνες που χρησιμοποιεί η μέθοδος SCOP (Murzin et al., 1995), υπεροικογένειες με κοινή δομή και μοτίβο αναδίπλωσης του καταλυτικού κέντρου κατηγοριοποιούνται στην ίδια αναδίπλωση (fold). Τέλος, αυτές οι κατηγορίες ομαδοποιούνται σύμφωνα με τα επικρατέστερα στοιχεία δευτεροταγούς δομής σε τάξη α, τάξη β, τάξη α/β και τάξη α+β. Πολλές υπεροικογένειες περιλαμβάνουν τόσο RNάσες όσο και DNάσες και σε ορισμένες περιπτώσεις υδρολάσες, όπως π.χ. φωσφατάσες.

Οι ριβονουκλεάσες κατατάσσονται κυρίως στις τάξεις α/β και α+β. Η κατηγορία α/β περιλαμβάνει πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από περιοχές με παράλληλα β πτυχωτά φύλλα μέσω βαβ μοτίβων. Αντίθετα οι πρωτεΐνες της κατηγορίας α+β χαρακτηρίζονται από αντιπαράλληλα β πτυχωτά φύλλα με διακριτές α και β περιοχές. Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας α/β έχουν καλύτερο σκελετό για κατάλυση καθώς συνδυάζουν την ελαστικότητα των α ελικών και την σταθερότητα των β φύλλων. Τέλος, υπάρχουν λίγες οικογένειες που εντάσσονται στις τάξεις α και β οι οποίες αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από α έλικες και β πτυχωτά φύλλα αντίστοιχα.

Πίνακας 1 : Οι κυριότερες Ριβονουκλεάσες.

Ενδοριβονουκλεάσες	Εξωριβονουκλεάσες
RNase A	Polynucleotide Phosphorylase
RNase P	RNase PH
RNase H	RNase II
RNase III	RNase R
RNase T1	RNase D
RNase T2	RNase T
RNase U2	Oligoribonuclease
RNase V1	Exoribonuclease I
RNase I	Exoribonuclease II
RNase L	
RNase PhyM	
RNase V	
Dicer	
Argonaute 2	

Η ριβονουκλεάση A

Η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα εμφανίζεται σε όλους τους ιστούς και τις εκκρίσεις των θηλαστικών και οι ριβονουκλεάσες διακρίνονται σε εκκρινόμενες και μη εκκρινόμενες. Οι εκκρινόμενες ριβονουκλεάσες εντοπίζονται στο πάγκρεας, στο σάλιο, στα ούρα και στον ορό του αίματος. Η ριβονουκλεάση A αποτελεί τον πιο χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τους. Οι μη εκκρινόμενες ριβονουκλεάσες εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ και τη σπλήνα, ενώ σε μικρότερο ποσοστό μπορούν να εντοπιστούν στα ούρα και τον ορό του αίματος.

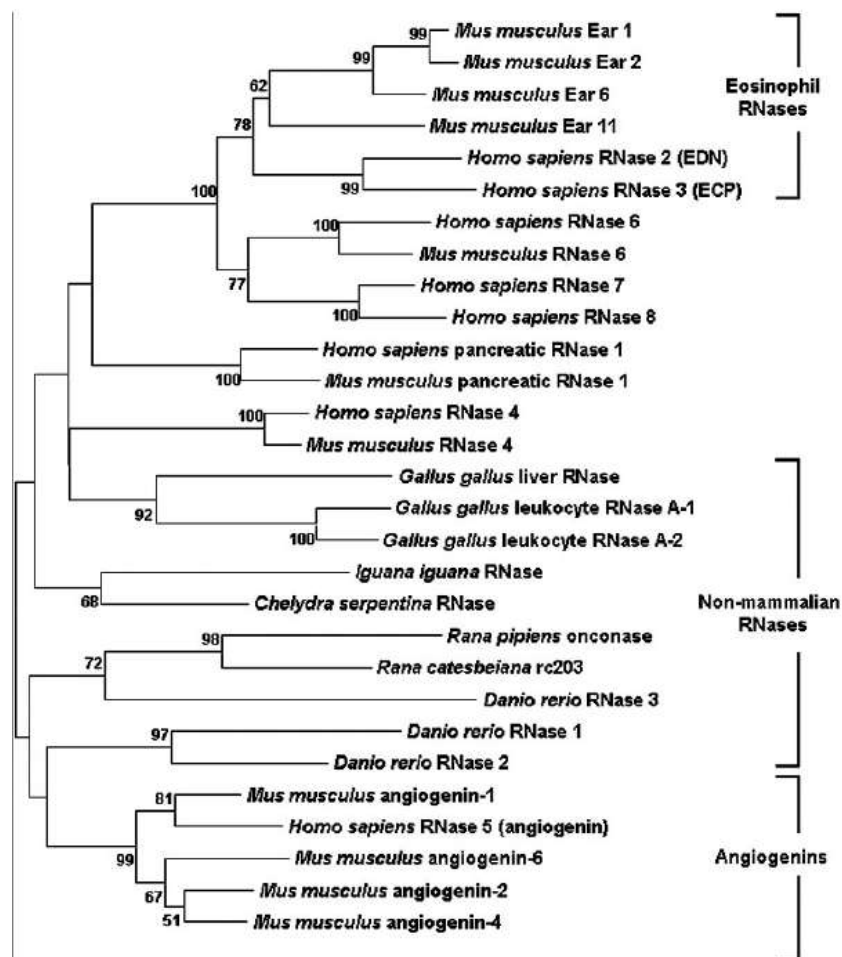
Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A είναι ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών. Η μελέτη του καταλυτικού της μηχανισμού συνέβαλε στην κατανόηση της εξέλιξης των γονιδίων της υπερικογένειας των ριβονουκλεασών.

Η ριβονουκλεάση A αρχικά απομονώθηκε από παγκρεατικό ιστό και αποτέλεσε το αγαπημένο θέμα των δομικών και λειτουργικών μελετών από το 1950 έως και το

1960. Σε αυτό συνέβαλε η θερμοσταθερότητα που την χαρακτηρίζει και η σχετικά άφθονη συγκέντρωσή της στον παγκρεατικό ιστό. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13.7 kDa που καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφοριλίωσης και μιας υδρόλυσης.

Το 1980 απομονώθηκαν πολλές φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A πρωτεΐνες από άλλους ιστούς. Μετά από κλωνοποίηση και αλληλούχηση των γονιδίων τους παρουσίασαν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπερικογένειας της Ριβονουκλεάσης A. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές ακόμα κυτταροτοξίνες (Rosenberg 2008).

Όλες οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπερικογένειας στην δραστική τους μορφή διαθέτουν μερικές χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Περιέχουν 6 έως 8 κατάλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες που σχηματίζουν δυσουλφιδικούς δεσμούς, 2 κατάλοιπα ιστιδινών και ένα κατάλοιπο λυσίνης, παρουσιάζοντας σταθερό αλληλουχικό μοτίβο (CKXXNTF). Τέλος κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπερικογένειας εντοπίζονται σε ένα μόνο εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 (Rosenberg 2008).



Η δομή της ριβονουκλεάσης A

Είκοσι διαφορετικά αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των πρωτεϊνών. Κάθε αμινοξύ παρουσιάζει μικρής ή μεγάλης εμβέλειας αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα αμινοξέα. Η διαμόρφωση που θα αποκτήσει στο χώρο η εκάστοτε αμινοξική αλληλουχία προσδίδει σταθερότητα και καθορίζει τη λειτουργία που θα επιτελέσει η πρωτεΐνη. Η αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος μπορεί να προκαλέσει διαφοροποιήσεις από τη φυσιολογική πρωτεΐνη. Συνεπώς, είναι σημαντικό να κατανοηθούν οι ιδιότητες του κάθε αμινοξέος ξεχωριστά, ώστε να προκύψουν σωστά συμπεράσματα για τον τρόπο αναδίπλωσης και για τη λειτουργία της ενδιαφερομένης πρωτεΐνης (Chatani and Hayashi 2001; Chatani, Tanimizu et al. 2001).

Η κρυσταλλική δομή της ριβονουκλεάσης A καθορίστηκε το 1967 σε ευκρίνεια 2 Å (Avey, Boles et al. 1967). Το ένζυμο εκκρινόμενο από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από 124 αμινοξέα, οι διαστάσεις του είναι 35x45x31 Å και ο μοριακός τύπος του φυσικού ουδέτερου ενζύμου είναι $C_{575}H_{907}N_{171}O_{192}S_{12}$. Στον σχηματισμό του ενζύμου λαμβάνουν μέρος τα 19 από τα 20 φυσικά αμινοξέα και ο ακριβής μοριακός όγκος του είναι 13.868 kDa.

Η ριβονουκλεάση A αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά β-κλώνους, οι οποίοι σχηματίζουν ένα β-πτυχωτό φύλλο (Εικόνα 3). Τα στοιχεία της δευτεροταγούς διαμόρφωσης μπορεί να θεωρηθούν ότι οργανώνονται σε δύο 'ομάδες'. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τη δεύτερη α-έλικα (α₂, κατάλοιπα 24-34), τον κεντρικό β-κλώνο (β₁, κατάλοιπα 41-45) και την κύρια β-φουρκέτα (β₄-β₅, κατάλοιπα 79-104), ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει την τρίτη α-έλικα (α₃, κατάλοιπα 50-60), τη β-φουρκέτα (β₂-β₃, κατάλοιπα 65-72) και την C-τελική φουρκέτα (β₆-β₇, κατάλοιπα 105-124) (Εικόνα 3). Οι δύο ομάδες συναντώνται σε μια θετικά φορτισμένη αύλακα στην οποία συνδέεται το υπόστρωμα RNA. Η N-τελική α-έλικα (α₁, κατάλοιπα 3-13) εντοπίζεται μεταξύ των 2 ομάδων συμβάλλοντας στην διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου με την His12. Η α₁ α-έλικα συνδέεται με τη υπόλοιπη πρωτεΐνη με ένα τμήμα (κατάλοιπα 16-23) το οποίο έχει υψηλούς θερμικούς τελεστές και εμφανίζεται ευκίνητο.

Ένα ιδιαίτερα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της ριβονουκλεάσης A είναι οι δισουλφιδικοί της δεσμοί. Υπάρχουν τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί στη φυσιολογική κατάσταση μεταξύ των κυστεϊνών 26-84, 40-95, 58-110 και 65-72. Οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί είναι ασυνήθιστα πολλοί για πρωτεΐνη τέτοιου μεγέθους, συμβάλλοντας σημαντικά στη σταθερότητα της. Αντικατάσταση οποιασδήποτε

κυστεΐνης με αλανίνη ή σερίνη μειώνει την θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί (26-84 και 58-110) ανάμεσα στη μία α -έλικα και το β -πτυχωτό φύλλο συμβάλλουν περισσότερο στην θερμική σταθερότητα από ότι οι άλλοι δύο [Stewart et al,1990].

Επιπλέον, η ριβονουκλεάση εμφανίζει τέσσερις X-Pro πεπτιδικούς δεσμούς, εκ των οποίων οι δύο εντοπίζονται σε διαμόρφωση *cis* (Tyr92-Pro93 και Asn113-114) και οι άλλοι δύο σε *trans* (Lys41-Pro42 και Val116-Pro117) στη φυσική κατάσταση. Αυτό είναι ασυνήθιστο γιατί η *cis* διαμόρφωση εμφανίζεται σε ποσοστό μόλις 6% στη φυσική δομή των πρωτεϊνών (Fairman, Shoemaker et al. 1990)[Stewart et al,1990].

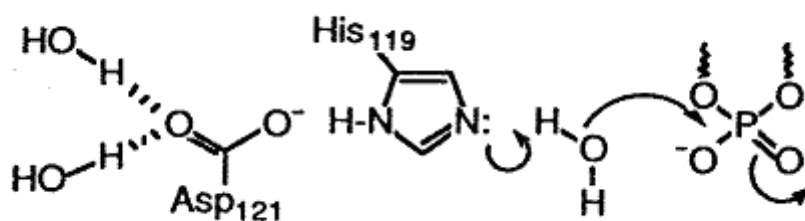


Εικόνα 3: Η δομή της ριβονουκλεάσης A.

Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της ριβονουκλεάσης A εδράζεται στο κέντρο του μορίου και διαμορφώνεται από τα αμινοξέα His12, His119 και Lys41. Οι θέσεις αυτές αποκαλύφθηκαν μετά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της RNάσης A. Η

συμμετοχή αυτών των αμινοξέων στον καταλυτικό μηχανισμό έχει επιβεβαιωθεί με πειράματα θέση κατευθυνόμενης σημειακής μεταλλαξιγένεσης καθώς και με κινητικές μελέτες. Οποιαδήποτε χημική μεταβολή σε αυτά τα αμινοξέα έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό της δραστηριότητας του ενζύμου. Επιπλέον, μελέτες με περιθλάση ακτίνων Χ αποκάλυψαν ότι τα αμινοξέα His12, His119 προκαλούν την κατάλυση ενώ τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA απέδειξαν πως αυτές λειτουργούν ως ένα οξύ και μια βάση αντίστοιχα ενώ η Lys41 σταθεροποιεί το ενδιάμεσο σύμπλοκο. Ο ρόλος της His119 στην κατάλυση (Εικόνα 4) δεν περιορίζεται μόνο στην πρωτονίωση ενός ατόμου οξυγόνου του υποστρώματος αλλά και στην σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης μέσω δεσμών υδρογόνου (Chatani and Hayashi 2001).



Εικόνα 4: Ο ρόλος των καταλυτικών αμινοξέων της ριβονουκλεάσης Α.

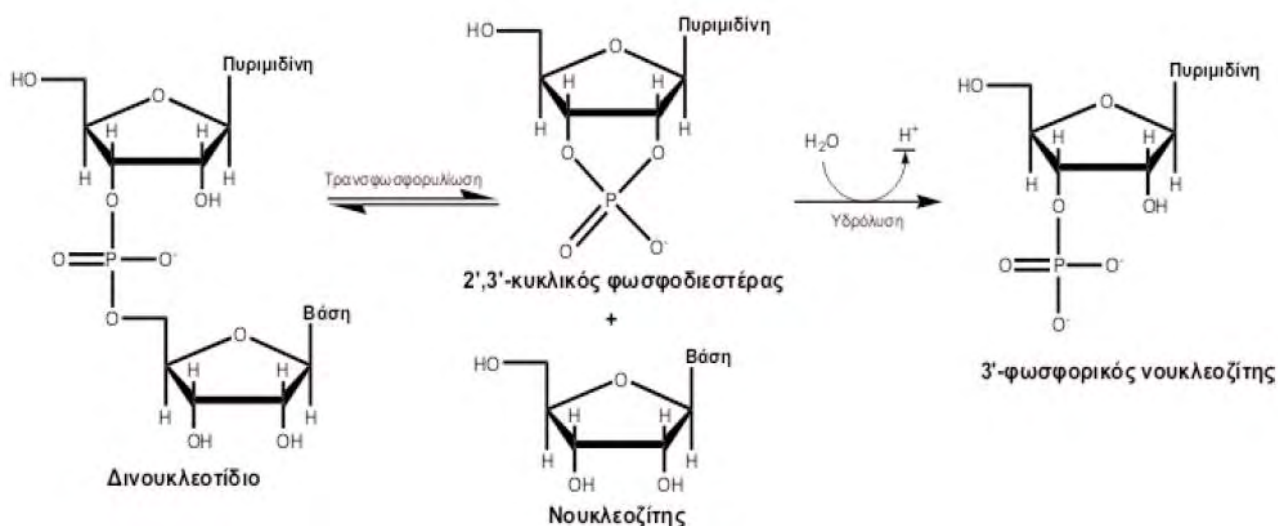
Ο καταλυτικός μηχανισμός

Η ριβονουκλεάση Α καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις αλυσίδες RNA σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η τρανσφωσφοριλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος οδηγεί στο σχηματισμό ενός κυκλικού φωσφορικού άκρου και την απελευθέρωση μιας 5'-υδροξυλομάδας (Εικόνα 5). Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστερα καθώς το ύδωρ αντιδρά με το κυκλικό φωσφορικό ενδιάμεσο σχηματίζοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα (Moussaoui, Nogues et al. 1998). Η αντίδραση τρανσφωσφοριλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε αντίθεση με την υδρόλυση η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-

φωσφοδιεστέρας δεν αποτελεί ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν που είναι δυνατό να απομονωθεί χωρίς δυσκολία καθώς σχηματίζεται πολύ πιο γρήγορα από ότι υδρολύεται. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά, παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για την αντίδραση της τρανσφωσφορυλίωσης [Stryer et al,1997].

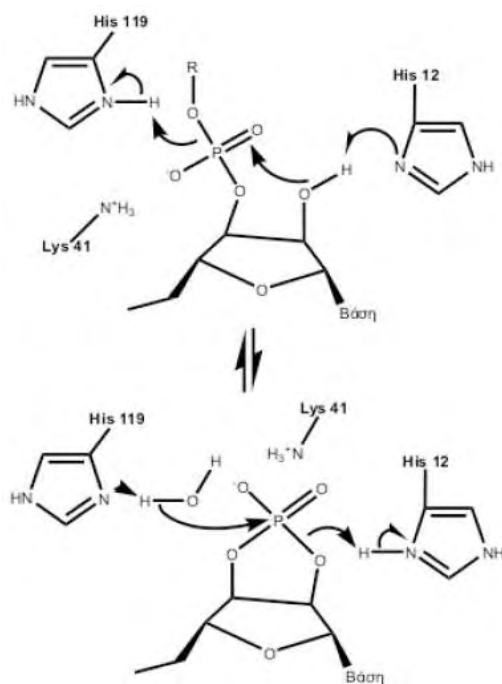
Το νουκλεοτίδιο το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys41. Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιο της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με το P, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O (Εικόνα 5). Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-O που είχε απομακρυνθεί (Εικόνα 5). Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH [Stryer et al,1997].



Εικόνα 5: Η αντίδραση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση Α.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-Ο βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας (Εικόνα 6). Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο Ο από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρηνόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται [Stryer et al,1997].



Εικόνα 6: Μηχανισμός κατάλυσης.

Ενζυμική Αναστολή

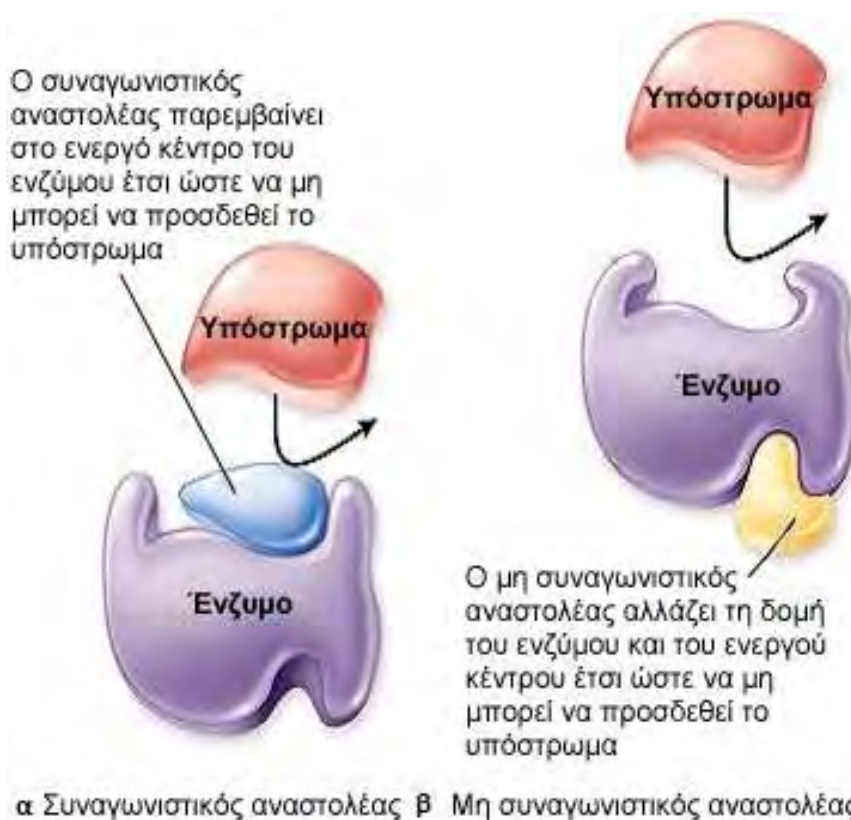
Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών

μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Η ρύθμιση των αλλοστερικών ενζύμων τυποποιεί το είδος του ελέγχου. Επιπλέον, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής των ενζύμων. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης : κατάλοιπα κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων.

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι πολύ σπουδαία φάρμακα. Η πενικιλίνη για παράδειγμα δρα τροποποιώντας ομοιοπολικά το ένζυμο τρανσπεπτιδάση και ως εκ τούτου σκοτώνει τα βακτήρια εμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η ασπιρίνη δρα τροποποιώντας ομοιοπολικά την κυκλοξυγονάση, ελαττώνοντας τη σύνθεση των φλεγμονωδών σημάτων.

Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υποστρώματα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 7). Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. 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. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδέονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ένα πιο περίπλοκο σχήμα, που ονομάζεται μεικτή αναστολή παράγεται όταν ένας

αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.



Εικόνα 7: α) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, β) 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.

Η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή είναι κινητικά διακριτές

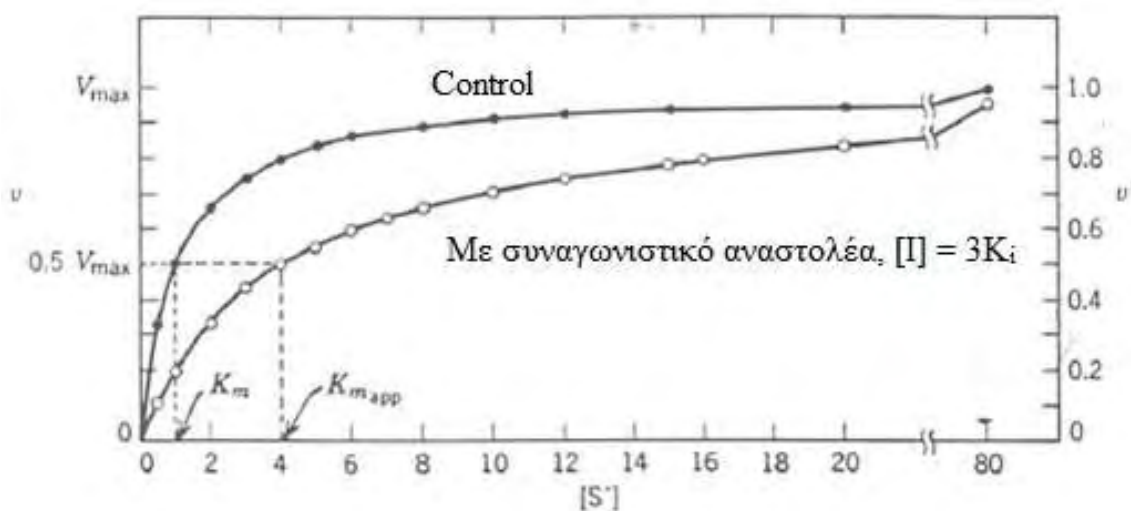
Προκειμένου να γίνει μια διάκριση στο είδος της αναστολής θα πρέπει να γίνουν κινητικές μελέτες. Ουσιαστικά θα πρέπει να γίνουν οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά αναστολής (K_i) δίνεται από τη σχέση

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φθάσει τη μέγιστη τιμή της (V_{max}) (Εικόνα 8), διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M , που καλείται K_M^{app} είναι αριθμητικά ίση με

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

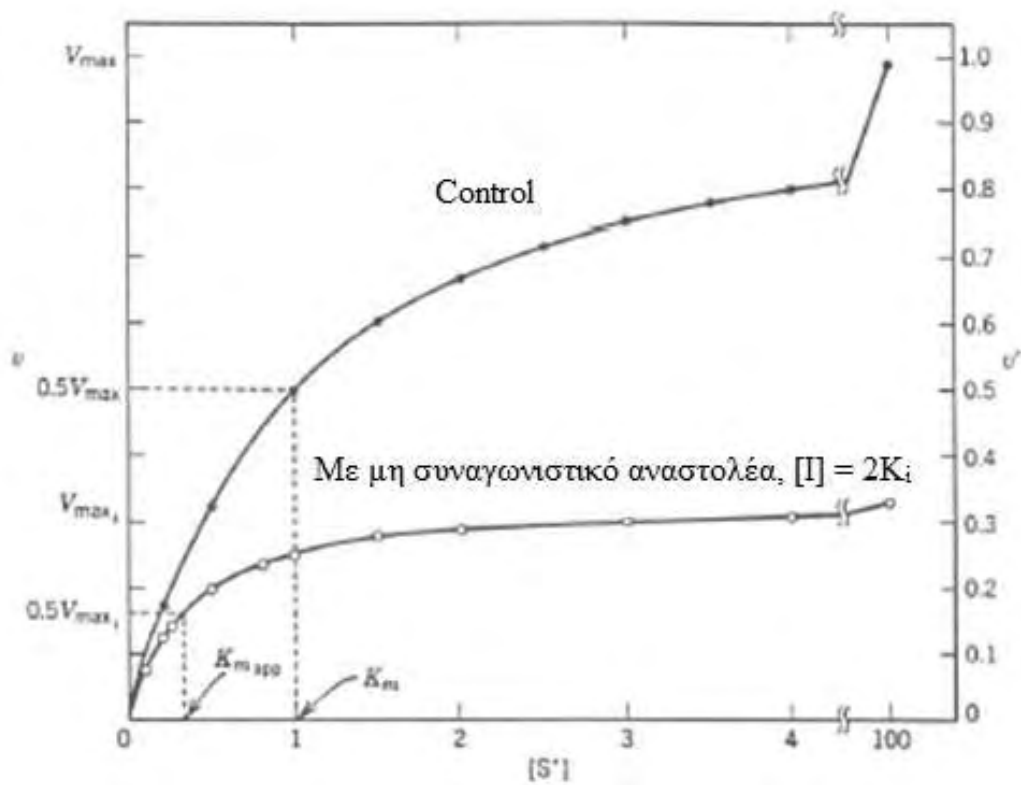
όπου $[I]$ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_M^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.



Εικόνα 8: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία συναγωνιστικού αναστολέα.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή (Εικόνα 9), το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου – αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου – αναστολέα – υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M . Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει

συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος .



Εικόνα 9: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα.

Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά.

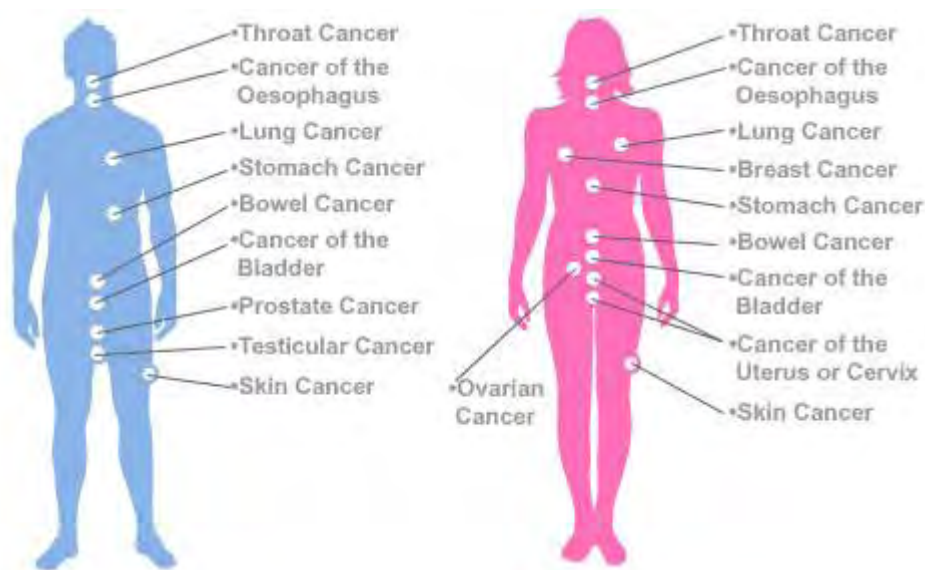
Τα κύτταρα στο σώμα μας, φυσιολογικά, αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Στα πρώτα χρόνια της ζωής, και μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου, ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι έντονος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαιρούνται μόνο για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν φθαρεί ή πεθάνει.

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα, διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα, εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδιώματος και χάρη σε ένα ένζυμο, την τελομεραση, που βρίσκεται μόνο στα γαμετικά κύτταρα και στα καρκινικά. Η νεοπλασία αρχίζει με μία μετάλλαξη σ' ένα κύτταρο, η οποία μεταβιβάζεται μέσω της μίτωσης σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα. Μετά από κάποιες διαιρέσεις, συμβαίνει μια δεύτερη μετάλλαξη που επίσης μεταβιβάζεται στα θυγατρικά κύτταρα κ.ο.κ. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν καρκίνο προσδίδουν στο κύτταρο ένα "πλεονέκτημα αύξησης" έναντι των φυσιολογικών κυττάρων, με συνέπεια να διαιρούνται πιο γρήγορα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Οι όγκοι είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος

Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες. Τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται στο άτομο εξαρτώνται από το μέγεθος του όγκου, από τη θέση του στο σώμα, από το στάδιο ανάπτυξής του, από το αν έχει εισβάλει στους γειτονικούς ιστούς και σε ποια έκταση και από το αν έχει υπάρξει μετάσταση.

Στην αρχή, ένας καρκίνος θα μεγαλώσει στο σημείο που πρωτοεμφανίστηκε. Αυτός ονομάζεται πρωτογενής καρκίνος. Ένας πρωτογενής καρκίνος μπορεί να μεγαλώσει τόσο, ώστε να προκαλέσει διάφορα συμπτώματα. Αργότερα μερικά από τα καρκινογόνα κύτταρα μπορεί να αποκολληθούν από τον πρωτογενή καρκίνο και να μετακινηθούν σε άλλα μέρη του σώματος. Ταξιδεύουν με την κυκλοφορία του αίματος ή μέσω του λυμφατικού συστήματος. Αυτοί ονομάζονται δευτερογενείς καρκίνοι ή μεταστάσεις. Μερικές φορές το άτομο δεν γνωρίζει ότι έχει καρκίνο μέχρι να του παρουσιαστούν συμπτώματα από το δευτερογενή καρκίνο.

Καρκίνος συνήθως προκύπτει από τις μεταλλάξεις σε τρία είδη γονιδίων: τα "ογκογονίδια" (oncogenes), που προάγουν την αύξηση και διαίρεση των κυττάρων, τα "ογκοκατασταλτικά γονίδια" (tumor-suppressor genes) που ελέγχουν τη κυτταρική διαίρεση και τα "γονίδια επιδιόρθωσης του DNA" που διορθώνουν ελαττωματικά γονίδια. Η πλειονότητα των ανθρώπινων καρκίνων (Εικόνα 10) δεν μπορεί να εξηγηθεί χρησιμοποιώντας μονογονιδιακά πρότυπα κληρονομικότητας. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι οι κοινοί καρκίνοι δεν επηρεάζονται γενετικά. Δεκαετίες έρευνας υποδεικνύουν ότι οι πρώτοι βαθμού συγγενείς ενός ατόμου με ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τον ίδιο όγκο. Τέτοιες αναλύσεις γίνονται πολύπλοκες εξαιτίας του ρόλου που παίζει το περιβάλλον όπως οι καρκινογόνες ουσίες (καπνός τσιγάρου, ακτινοβολία, χημικές ουσίες) και ο τρόπος ζωής καθώς στο πολυπαραγοντικό μοντέλο συμβάλουν επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων και προδιαθεσικών γονιδίων.



Εικόνα 10: Τύποι καρκίνου.

Καρκίνος και Ριβονουκλεάσες

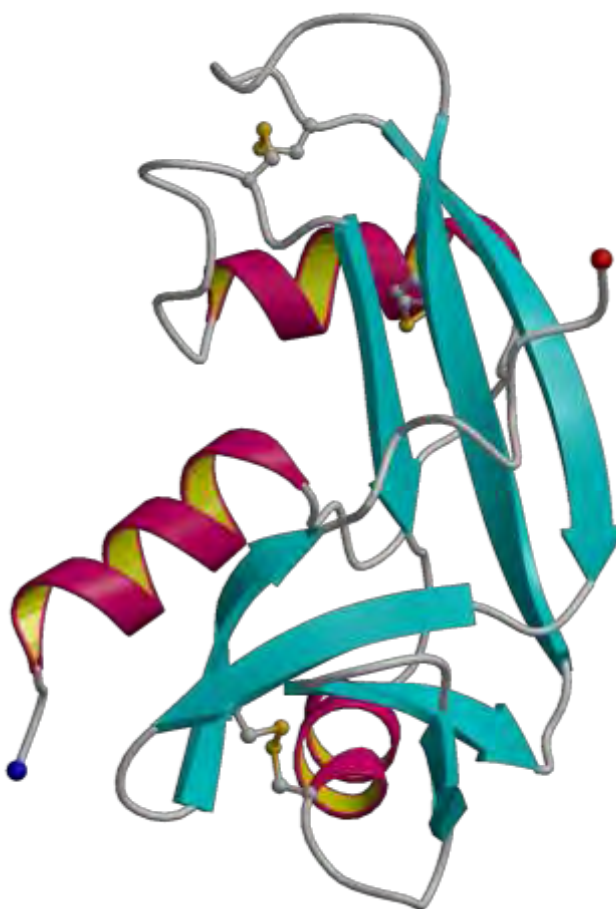
Στον γενικό όρο RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions) περιλαμβάνονται ριβονουκλεάσες με διάφορες βιολογικές λειτουργίες πέρα από την συνήθη καταλυτική τους δράση ως ένζυμα (D'Alessio, Di Donato et al. 1991). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προσπάθεια αξιοποίησης των ριβονουκλεασών στην θεραπεία του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές από αυτές έχουν αντικαρκινική δράση ενώ άλλες προάγουν τη δημιουργία όγκων. Για παράδειγμα η βοεΐα σπερματική ριβονουκλεάση (BS-RNase) μία ομοδιμερής ριβονουκλεάση της οικογένειας της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RNase A), είναι ένας σημαντικός αντικαρκινικός παράγοντας μιας και εμφανίζει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*.

Από την άλλη αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη (Εικόνα 11) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων καθώς προωθεί την αγγειογένεση (Fett, Bethune et al. 1987). Ουσιαστικά με την αγγειογένεση επιτυγχάνεται η τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Ταυτόχρονα 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. Επομένως, αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν την ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao, Jenkins et al. 2002). Αντίστοιχα μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την δράση του ενζύμου, ενισχύουν την δραστηριότητα της αγγειογένεσης (Bond and Vallee 1990), (Curran, Shapiro et al. 1993), (Hallahan, Shapiro et al. 1992), (Rybak, Auld et al. 1989), (Shapiro and Vallee 1989).

Αντιλαμβανόμαστε ότι 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 (Leland, Schultz et al. 1998). Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα θα γίνει

χορήγηση των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση, οι οποίες δεν δεσμεύονται από τον πρωτεϊνικό αναστολέα RI, οδηγώντας στην καταστολή του όγκου.

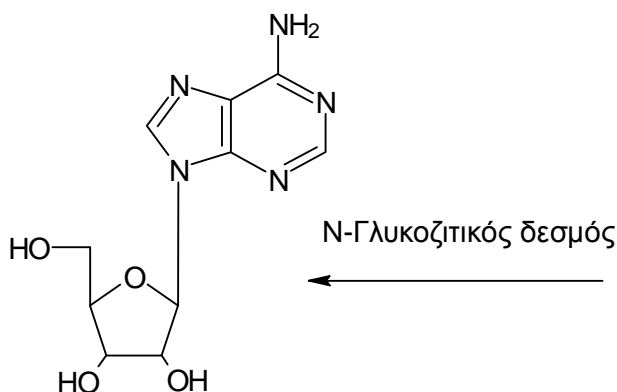
Προκειμένου να δημιουργήσουμε αναστολείς της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως “μοντέλο” την ριβονουκλεάση A καθώς εμφανίζει μεγάλη αμινοξική και δομική ομολογία με την αγγειογενίνη ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100%. Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της 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 (Leonidas, Chavali et al. 2003).



Εικόνα 11: Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης.

Οι Νουκλεοζίτες

Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β -*N*-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα *N*-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης συνηθίζεται σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Εικόνα 12).



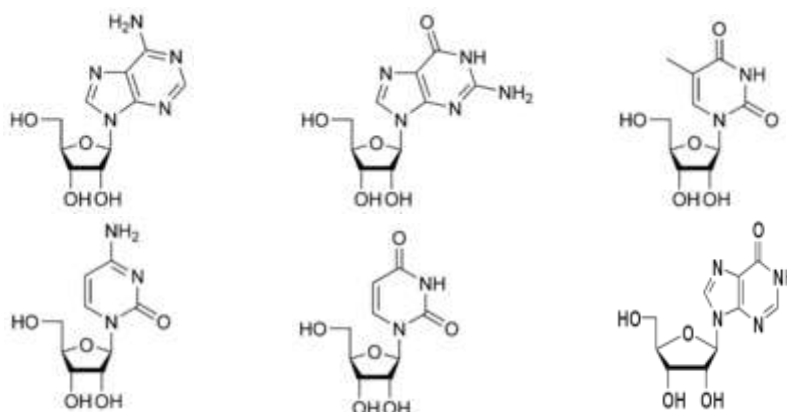
Εικόνα 12: Η αδενοσίνη.

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή αν η πεντόζη είναι δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Μερικά παραδείγματα νουκλεοζιτών φαίνονται στην Εικόνα 13.

Οι νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά νουκλεοζιτών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω των

ιδιοτήτων τους καθώς τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιαυτικούς παράγοντες. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αντιοξειδωτικά. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Προκειμένου να διερευνηθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

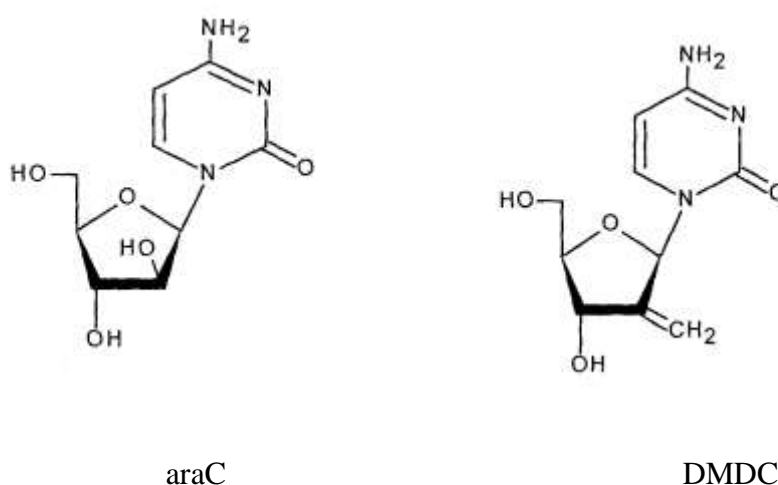


Εικόνα 13: Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη, θυμιδίνη, ουριδίνη, ινοσίνη).

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες καθώς παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες. Αυτές τους οι ιδιότητες τους καθιστούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Agelis, Tzioumaki et al. 2008), (Agelis, Tzioumaki et al. 2007), (Manta, Agelis et al. 2008). Έχει διαπιστωθεί η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. , 2010), (Bhat U. G. 2010). Ακόμη, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα (Halliwell B. 2001).

Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στην ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου. Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), παρουσίασε ότι οι νουκλεοζίτες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν

εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1- β -D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (Blair, Saracci et al.) , 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο- β -D-ερυθροπεντο-φουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), που φαίνονται στην Εικόνα 14, έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους



Εικόνα 14: Οι νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες araC και DMDC.

Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών όπως είναι γνωστό πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά

τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ενζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικά ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα .

Τα αντικαρκινικά και τα αντικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ικές πολυμεράσες. Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα.

εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία .

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή . Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες,. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

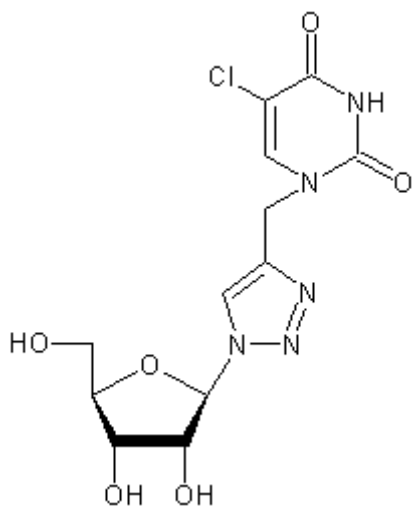
Αντιδραστήρια	Εταιρεία
Οξικό Οξύ(100%) [CH ₃ COOH]	Merck
Οξικό Νάτριο [C ₂ H ₃ Na ₂]	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Lanthanum Nitrate [La(NO ₃) ₃ ·6(H ₂ O)]	Sigma
Μεθανόλη [CH ₃ OH]	Applichem
Περχλωρικό Οξύ [HClO ₄]	Fluka

Ένζυμο

Ένζυμο	Εταιρεία
Bovine pancreatic RNase A type XIIA	Sigma

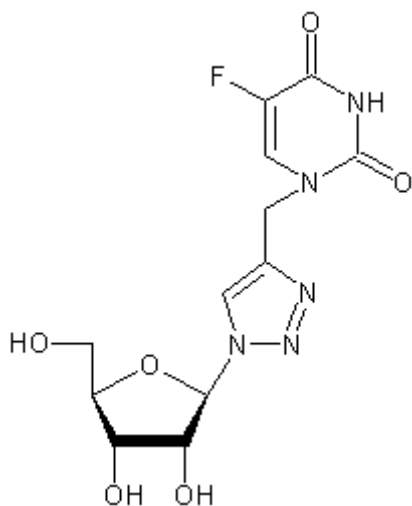
Νουκλεοτίδια και συνθετικό νουκλεοσίδιο

tRNA από εκχύλισμα ζύμης Sigma



1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωρουρακίλη

$M_r = 345,70$



1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-φθορουρακίλη

$M_r = 329.24$

Γνωρίζοντας ότι η K_m του ενζύμου είναι $1\mu\text{M}$ φτιάξαμε κατάλληλες συγκεντρώσεις της ένωσης ώστε να χρησιμοποιήσουμε συγκεντρώσεις από $1\mu\text{M} - 100\mu\text{M}$. Διαλύσαμε σε μεθανόλη τις ενώσεις σε αρχική συγκέντρωση 10mM με βάση το μοριακό τους βάρος (M_r) και στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αραιώση 3mM .

Το συνθετικά νουκλεοσίδια συντέθηκαν και παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Διευθυντής : Αν. Καθ. Δημήτριος Κομιώτης).

Διαλύματα της πειραματικής διαδικασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα AcONa/AcOH

Οξικό Νάτριο $\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.2M , $\text{pH} 6.0$): χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH (σε τιμή 6.0) και η ιοντική ισχύς. Εταιρία Mallinckrodt Chemical Works.

Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer)

$0.2\text{M NaH}_2\text{PO}_4/\text{HCl}$, $\text{pH}=7,4$ με τελικό όγκο 100ml .

Σε διάλυμα αντίδρασης διαλύουμε και το υπόστρωμα tRNA.

Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (Stop solution)

Το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και Perchloric acid 6%. Η αντίδραση σταματά σε διάφορους χρόνους με την ανάμιξη 300μl του διαλύματος αντίδρασης με 300μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (stop solution).

Φασματοφωτομέτρηση

Κυψελίδα χαλαζία 1cm



Φασματοφωτόμετρο Genesis 10UV

Μέθοδοι

Μέτρηση Συγκεντρώσεων

Οι συγκεντρώσεις της βοείας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A προσδιορίζονται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 278 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{278}=9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1cm (Sela and Anfinsen 1957), (Dostal and Matousek 1973)

Οι συγκεντρώσεις του tRNA προσδιορίζονται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{260}=9250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1cm (Sela and Anfinsen 1957), (Dostal and Matousek 1973)

Διαδικασία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της RNase A απουσία και παρουσία αναστολέα

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην απορρόφηση του RNA στα 260nm. 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 υπολογίζεται η απορρόφηση τους με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου. Η αποικοδόμηση του RNA από τη ριβονουκλεάση A πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφορυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιάμεσου. Η ταχύτητα της τρανσφωσφορυλίωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν της υδρόλυσης και ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα.

Πρότυπη Καμπύλη tRNA

Πρόκειται για μια καμπύλη αναφοράς που συσχετίζει την απορρόφηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Χρησιμοποιούμε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος (αναδιαλυμένο σε Reaction Buffer) τα οποία εν

συνεχία φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 260nm. Από τις τιμές που προκύπτουν κατασκευάζεται μια γραφική παράσταση από την οποία προκύπτει η εξίσωση $A = f(C)$. Με βάση την εξίσωση αυτή μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του υποστρώματος σε διαλύματα γνωρίζοντας την απορρόφηση, εφόσον βέβαια εμπίπτουν μέσα στα όρια γραμμικότητας της καμπύλης.

Χρονοκαμπύλη

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 σε διαφόρους χρόνους αναμιγνύοντας 300 μl από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μl διαλύματος (Διάλυμα τερματισμού) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid. 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. Έπειτα από δοκιμές, συμπεράναμε πως ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης είναι το 1 min.

Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis Menten

Η K_m είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όταν τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από το υπόστρωμα. 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 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 για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι : 2μM, 4μM , 5μM, 6μM και 7μM. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του yeast tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται

για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 600 μl, ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Η καμπύλη για ένα μικρό χρονικό διάστημα μπορεί να θεωρηθεί ως ευθεία. Με τη βοήθεια του προγράμματος Grafit (Leatherbarrow RJ (1998) Grafit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK.) προσδιορίζεται 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 της αντίδρασης σύμφωνα με τον τύπο

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

ΔA	Ρυθμός απορρόφησης: η κλίση της ευθείας
ε	Συντελεστής απορρόφησης
λ	Μήκος κύματος (260 nm)
[RNase]	Συγκέντρωση του ενζύμου

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τόσο της K_m όσο 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). Η K_m και η V_{max} υπολογίζονται σύμφωνα με την εξίσωση(1) των Michaelis-Menten.

$$(1) \quad v = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Το πρόγραμμα Grafit χρησιμοποιώντας τα δεδομένα στην εξίσωση υπολογίζει την K_m και την V_{max} δίνοντας ταυτόχρονα και το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνεται και το γράφημα Lineweaver-Burk. Έτσι επιτυγχάνεται ο υπολογισμός της K_m και της V_{max} της RNase A.

Πειραματική διαδικασία

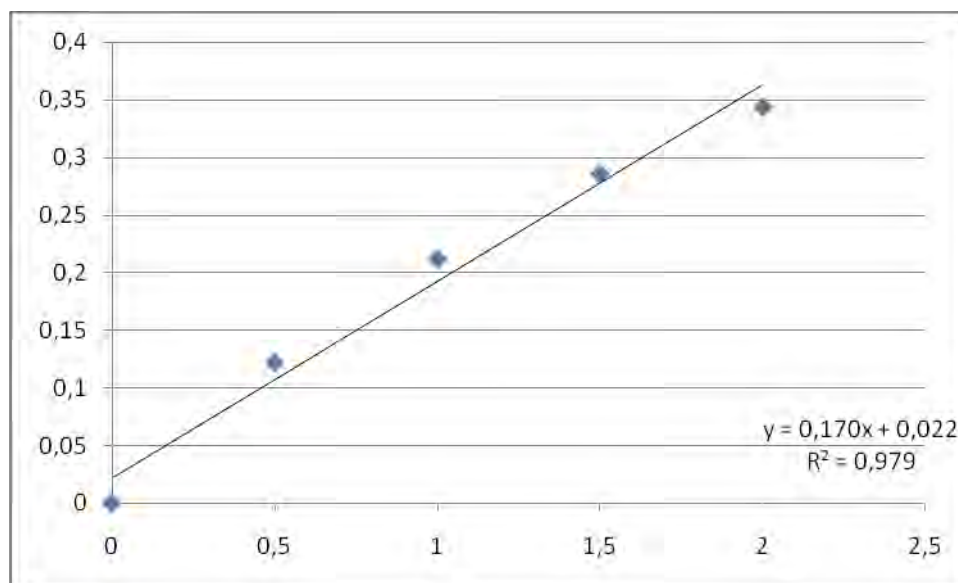
1. Τα δείγματα προετοιμάζονται στον πάγο. Προσθέτουμε κατάλληλες ποσότητες διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer), υποστρώματος tRNA και αναστολέα όπου απαιτείται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο έτσι ώστε να μην αλλοιώνεται το υπόστρωμα.
2. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 30 °C. Αυτό συμβαίνει καθώς 30°C είναι η θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.
3. Προστίθεται το ένζυμο RNase A έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση
4. Ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης είναι το 1 min. (σύμφωνα με την χρονοκαμπύλη)
5. Προσθήκη διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (Διάλυμα τερματισμού) προκειμένου η αντίδραση να σταματήσει.
6. Φυγοκέντρηση 14.500 rpm στους 4°C για 15 min. Με αυτό τον τρόπο κατακρημνίζεται το αδιάλυτο υπόστρωμα παρουσία Lanthanum Nitrate και Perchloric Acid.
7. Φασματοφωτομέτρηση του υπερκείμενου σε μήκος κύματος 260nm. Το υδρολυμένο tRNA εντοπίζεται στο υπερκείμενο και φωτομετρείται.
8. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του υδρολυμένου tRNA σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Μετά την προσθήκη του διαλύματος αντίδρασης τα δείγματα επωάστηκαν για 10min στους 30°C και η φωτομέτρηση έγινε στα 260nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με το διάλυμα αντίδρασης μόνο.

Πίνακας 2: Προετοιμασία δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Τελική Συγκέντρωση tRNA (μM)	0	0,5	1	1,5	2
Διάλυμα Αντίδρασης (μl)	600,00	570,00	540,00	510,00	480,00
tRNA (10uM) (μl)	0	30,00	60,00	90,00	120,00
ABS ₂₆₀	0	0.122	0.212	0.286	0.344



Εικόνα 15 : Πρότυπη καμπύλη tRNA

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής του ενζύμου από τις ενώσεις προχωρήσαμε σε κινητική πειράματα, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των ενώσεων. Οι χρόνοι των αντιδράσεων ήταν 1min. Με τη βοήθεια του προγράμματος Grafit σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk (διπλού ανάστροφου) σύμφωνα με τα οποία μπορεί να καθοριστεί το είδος της ενζυμικής

αναστολής που προκαλεί η ένωση που χρησιμοποιήθηκε. Ταυτόχρονα με το πρόγραμμα Grafit προσδιορίστηκε η V_{max} και η K_m (Πίνακας 3) του ενζύμου καθώς και οι K_M^{app} . Αυτές είναι απαραίτητες για τον υπολογισμό της K_i μέσω της οποίας θα εξάγουμε το συμπέρασμα για το είδος της ενζυμικής αναστολής.

Πίνακας 3 : V_{max} και K_m του ενζύμου

V_{max}	K_m
8.53	10.47

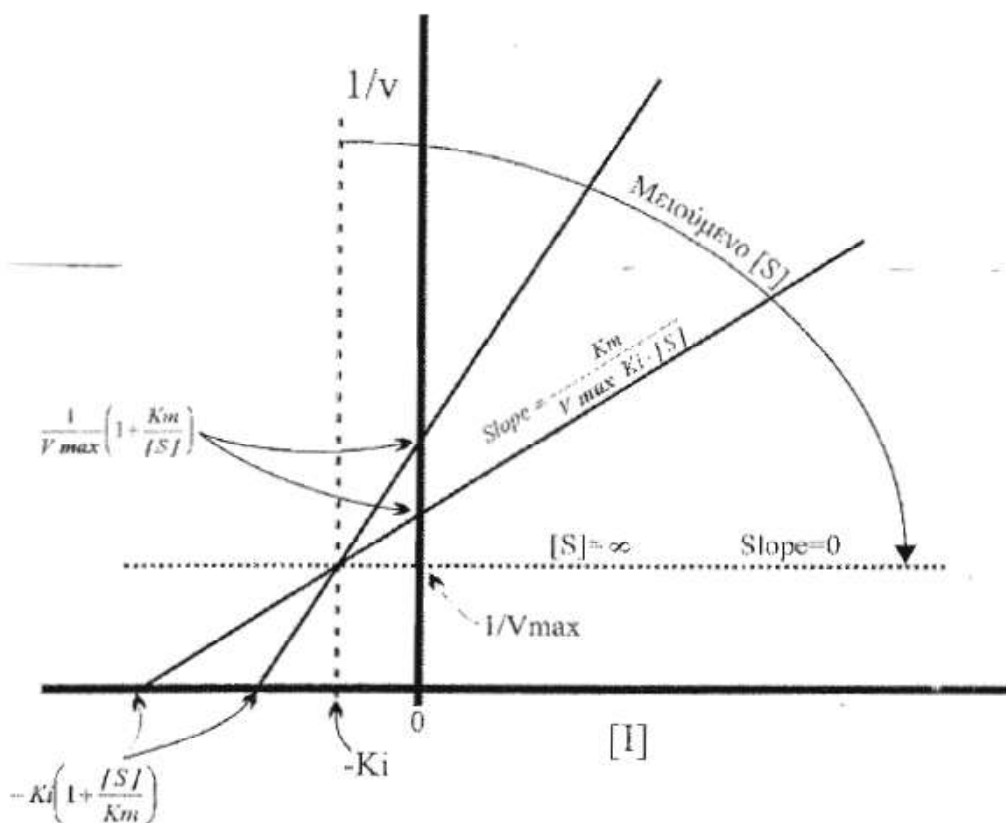
Υπολογισμός της K_i

Σύμφωνα με τη μέθοδο Dixon (Segel, 1975) γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων για τον υπολογισμό της K_i . Σύμφωνα με αυτήν ισχύει :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S] K_i} [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

όπου $[S]$ και $[I]$ οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του αναστολέα αντίστοιχα.

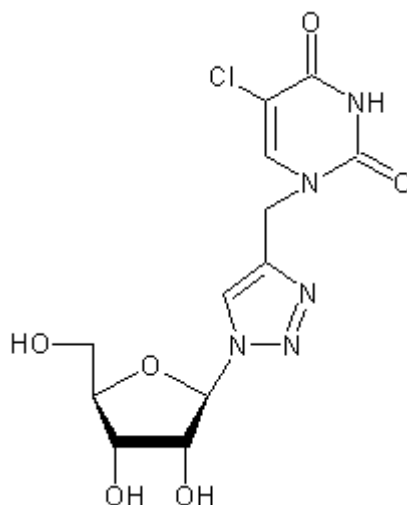
Ένα γράφημα του $1/V$ προς τη συγκέντρωση του αναστολέα $[I]$ σε κάποια δεδομένη συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$ δίνει μία ευθεία γραμμή με κλίση $K_m/(V_{max} \cdot [S] \cdot K_i)$ όπως φαίνεται στην εικόνα 16. Εάν ο αναστολέας είναι συναγωνιστικός και είναι γνωστή η V_{max} , μπορεί να σχεδιαστεί μια οριζόντια γραμμή στο ύψος του $1/V_{max}$ (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 : Γράφημα του $1/v$ ως προς $[I]$ με βάση τη μέθοδο Dixon για συναγωνιστικό αναστολέα με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Εάν είναι γνωστή η V_{max} , μπορεί να σχεδιαστεί μια οριζόντια γραμμή στο ύψος του $1/V_{max}$.

Το πρόγραμμα χρησιμοποιώντας τις ταχύτητες των αντιδράσεων από όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα σχεδιάζει τα γραφήματα. Η απόλυτη τιμή του σημείου τομής των ευθειών αντιστοιχεί στην τιμή της K_i . Εναλλακτικά, η K_i μπορεί να προσδιοριστεί αλγεβρικά. Στο σημείο τομής των ευθειών ισχύει $1/V_1=1/V_2$. Από την επίλυση αυτής της εξίσωσης προκύπτει ότι $K_i=-[I]$. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της K_i . Επίσης, ο υπολογισμός της τιμής του K_i μπορεί να γίνει από το διάγραμμα των K_M^{app} σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ένωσης. Στο σημείο όπου ο άξονας τέμνεται από την ευθεία που δημιουργείται είναι η τιμή της K_i .

Κινητική μελέτη με αναστολέα 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωρουρακίλη.



Εικόνα 17 : Χημικός τύπος της 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωρουρακίλη.

Προκειμένου να μελετήσουμε την ύπαρξη αναστολής όπως δράσης όπως RNase A αλλά και το είδος όπως αναστολής από την ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωρουρακίλη πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αντιδράσεις σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA με χρόνο αντίδρασης 1min. Σύμφωνα με όπως απορροφήσεις στα 260nm όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδρολυμένου tRNA κάθε φορά.

Οι παρακάτω έξι αντιδράσεις γίνονται απουσία αναστολέα για ένα λεπτό στους 30°C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM), παρουσία διαλύματος αντίδρασης και φυσικά του ενζύμου RNase A. Για να σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιούμε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης.

Πίνακας 4 : Αντιδράσεις απουσία αναστολέα.

tRNA conc	10nM Rnase A		t=1min				DRUG conc 0uM		T=30°C	
	T _{E-S}		A _{E-S}							
	0 uM	2,0uM	3,0uM	4,0uM	5,0uM	6,0uM				
δ/μα αντιδρ.	300.0	270.0	260.0	250.0	240.0	230.0				
tRNA (60,0uM)	0.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0				
11VP004 (300uM)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
RNase A (0,6uM)	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0				
STOP buffer	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0				

Οι παρακάτω έξι αντιδράσεις γίνονται παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 2μM για ένα λεπτό όπως 30°C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM), παρουσία διαλύματος αντίδρασης και φυσικά του ενζύμου RNase A σε συγκέντρωση 10nM. Για να σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιούμε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης.

Πίνακας 5 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 2μM.

10nM Rnase A	t=1min	DRUG conc 2uM					T=30°C
	T _{E-S-D}	A _{E-S-D}					
tRNA conc	0 uM	2,0uM	3,0uM	4,0uM	5,0uM	6,0uM	
δ/μα αντιδρ.	296.0	266.0	256.0	246.0	236.0	226.0	
tRNA (60,0uM)	0.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	
11VP004 (300uM)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
RNase A (0,6uM)	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
STOP buffer	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	

Οι παρακάτω έξι αντιδράσεις γίνονται παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 10μM για ένα λεπτό της 30°C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM), παρουσία διαλύματος αντίδρασης και του ενζύμου RNase A σε συγκέντρωση 10nM. Για να σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιούμε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης.

Πίνακας 6 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 10μM.

10nM Rnase A	t=1min	DRUG conc 10uM					T=30°C
	T _{E-S}	A _{E-S}					
tRNA conc	0 uM	2,0uM	3,0uM	4,0uM	5,0uM	6,0uM	
δ/μα αντιδρ.	270.0	250.0	240.0	230.0	220.0	210.0	
tRNA (60,0uM)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	
11VP004 (300uM)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	
RNase A (0,6uM)	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
STOP buffer	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	

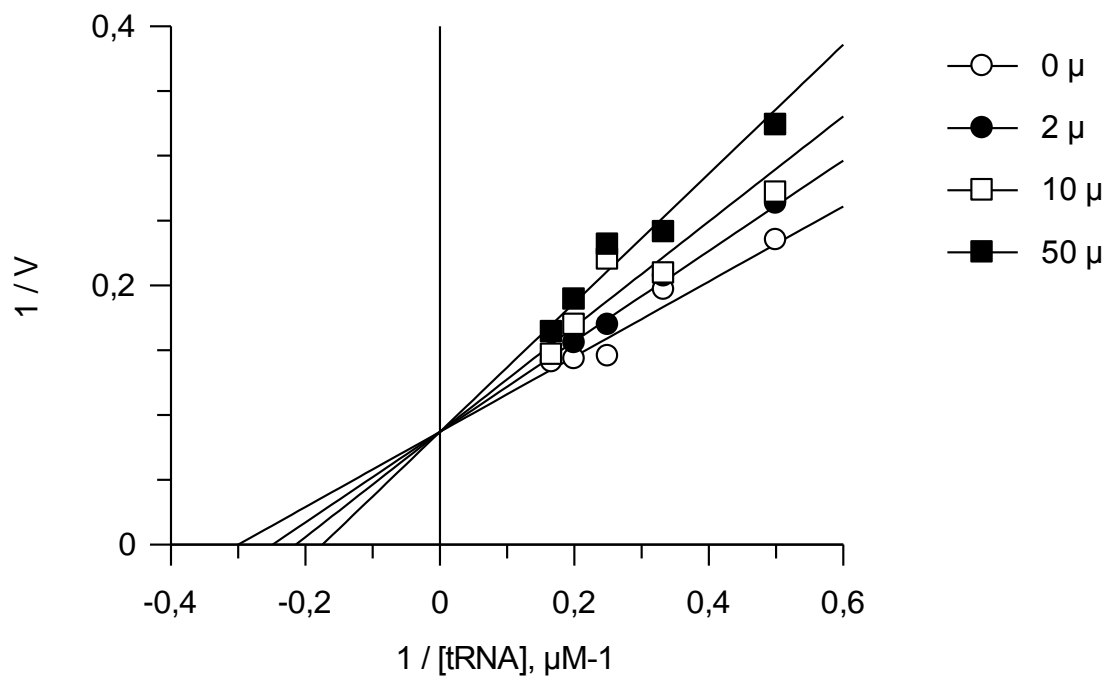
Οι παρακάτω έξι αντιδράσεις γίνονται παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 50μM για ένα λεπτό στους 30°C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0μM, 2μM,

3μM, 4μM, 5μM, 6μM), παρουσία διαλύματος αντίδρασης και του ενζύμου σε συγκέντρωση 10nM. Για να σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιούμε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης.

Πίνακας 7 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 50μM.

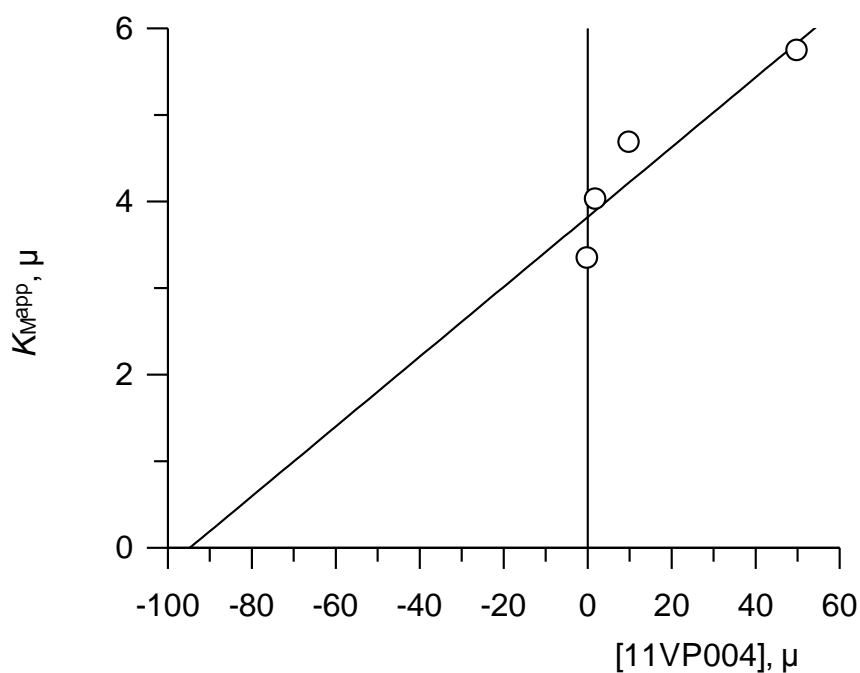
10nM Rnase A	t=1min	DRUG conc 50uM					T=30°C
	T _{E-S}	A _{E-S}					
tRNA conc	0 uM	2,0uM	3,0uM	4,0uM	5,0uM	6,0uM	
δ/μα αντιδρ.	280.0	250.0	240.0	230.0	220.0	210.0	
tRNA (60,0uM)	0.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	
11VP004(1,5uM)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	
RNase A (0,6uM)	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
STOP buffer	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	

Από τις απορροφήσεις υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδρολυμένου tRNA για κάθε αντίδραση ξεχωριστά. Με την βοήθεια του GraFit υπολογίστηκαν οι V_{max} , K_m , K_M^{app} και σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα Lineweaver-Burk έτσι ώστε να καθοριστεί το είδος της ενζυμικής αναστολής και να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής K_i . Έτσι προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα Lineweaver-Burk στο οποίο φαίνεται ότι το είδος της αναστολής είναι συναγωνιστική. (Εικόνα 18)



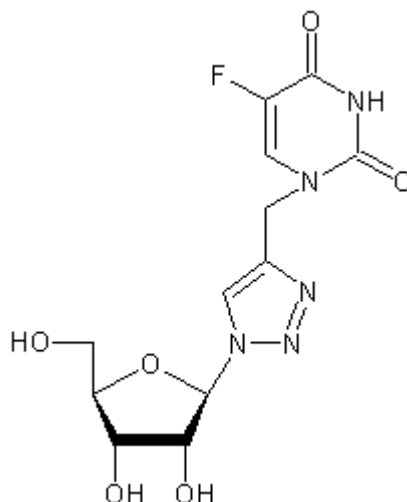
Εικόνα 18 : Διάγραμμα Lineweaver-Burk για συγκεντρώσεις 0μM, 2μM, 10μM και 50μM της ουσίας 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωροουρακίλη.

Η K_i μπορεί να προσδιοριστεί από το διάγραμμα του συνόλου των K_M^{app} σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας. Το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα X είναι και η τιμή της K_i της ουσίας. Έτσι από το παρακάτω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η τιμή της K_i είναι 94,76μM για την ουσία 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωροουρακίλη.



Εικόνα 19 : Διάγραμμα για τον προσδιορισμό της K_i .

Κινητική μελέτη με αναστολέα 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη



Εικόνα 20 : Ο χημικός τύπος της ένωσης 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη.

Όπως και με την πρώτη ένωση έτσι και εδώ έγιναν οι παρακάτω αντιδράσεις έτσι ώστε να επιτευχθεί η κινητική μελέτη με αναστολέα την ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα (0μM, 1μM, 10μM, 100μM) και έγιναν οι παρακάτω αντιδράσεις :

Πίνακας 8 : Αντιδράσεις απουσία αναστολέα.

10nM Rnase A t=1min DRUG conc 0uM	A _{E-S}					
	T _{E-S}	0 uM	2,0uM	3,0uM	4,0uM	5,0uM
δ/μα αντιδρ.	290,0	270,0	260,0	250,0	240,0	230,0
tRNA (60,0uM)	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
DRUG 11VP005 (3mM)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RNase A (0,6uM)	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
STOP buffer	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0

Πίνακας 9 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 1 μ M.

10nM Rnase A	t=1min	A _{E-S-K}					
		T _{E-S-K}					
DRUG conc 1,0 μ M		0 μ M	2,0 μ M	3,0 μ M	4,0 μ M	5,0 μ M	6,0 μ M
δ/μ α αντιδρ.		287,0	267,0	257,0	247,0	237,0	227,0
tRNA (60,0 μ M)		10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
DRUG 11VP005 (200 μ M)		3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
RNase A (0,6 μ M)		0,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
STOP buffer		300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0

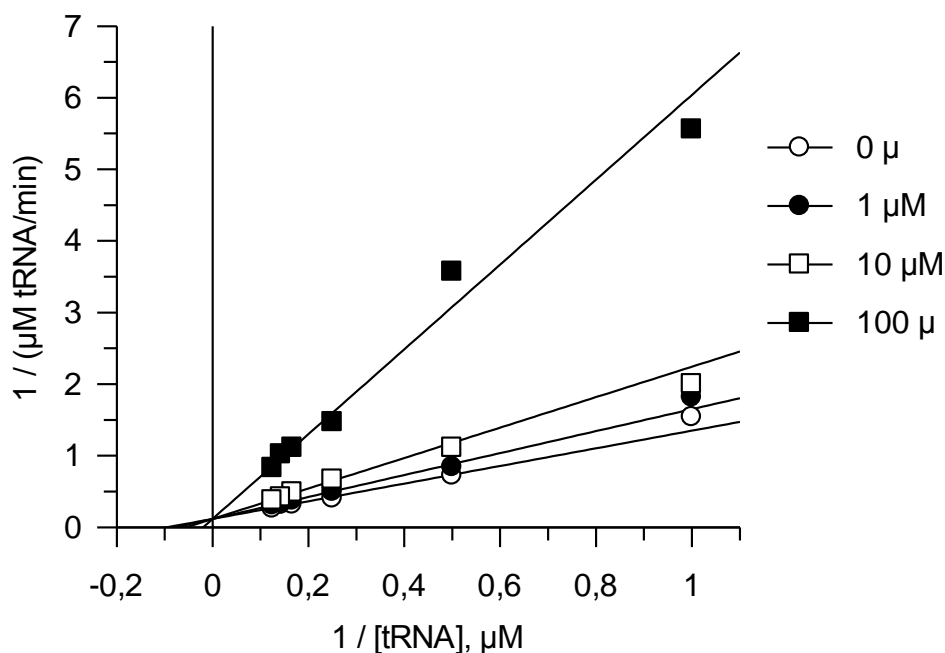
Πίνακας 10 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 10 μ M.

10nM Rnase A	t=1min	A _{E-S-K}					
		T _{E-S-K}					
DRUG conc 10 μ M		0 μ M	2,0 μ M	3,0 μ M	4,0 μ M	5,0 μ M	6,0 μ M
δ/μ α αντιδρ.		288,0	268,0	258,0	248,0	238,0	228,0
tRNA (60,0 μ M)		10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
DRUG 11VP005 (3mM)		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
RNase A (0,6 μ M)		0,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
STOP buffer		300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0

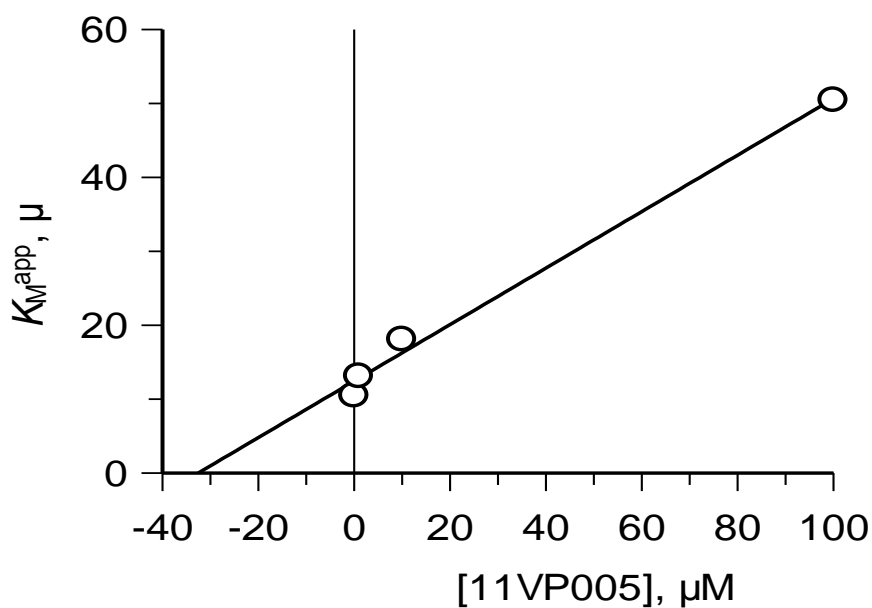
Πίνακας 11 : Αντιδράσεις παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 100 μ M.

10nM Rnase A	t=1min	A _{E-S-K}					
		T _{E-S-K}					
DRUG conc 100 μ M		0 μ M	2,0 μ M	3,0 μ M	4,0 μ M	5,0 μ M	6,0 μ M
δ/μ α αντιδρ.		270,0	250,0	240,0	230,0	220,0	210,0
tRNA (60,0 μ M)		10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
DRUG 11VP005 (3mM)		20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
RNase A (0,6 μ M)		0,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
STOP buffer		300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0

Ακριβώς όπως και στην προηγούμενη ουσία υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδρολυμένου tRNA για κάθε αντίδραση ξεχωριστά και υπολογίστηκαν οι V_{max} , K_m , K_M^{app} και σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα Lineweaver-Burk με τη βοήθεια του GraFit από τα οποία φαίνεται ότι το είδος της αναστολής είναι συναγωνιστική (Εικόνα 21).



Εικόνα 21 : Διάγραμμα Lineweaver-Burk για συγκεντρώσεις 0μM, 1μM, 10μM και 100μM της ουσίας 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη.



Εικόνα 22 : Διάγραμμα για τον προσδιορισμό της K_i .

Η K_i μπορεί να προσδιοριστεί από το διάγραμμα του συνόλου των K_M^{app} σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ένωσης. Το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα X είναι και η τιμή της K_i της ουσίας. Έτσι από το παρακάτω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η τιμή της K_i είναι 32,50μM για την ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη.

Συζήτηση

Οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ως προς την αναστολή τους έναντι της RNase A εμφάνισαν συναγωνιστική αναστολή σε σχέση με το υπόστρωμα (tRNA) με σταθερές αναστολής $K_i = 94,76\mu\text{M}$ για την ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-χλωροουρακίλη και $K_i = 32,50\mu\text{M}$ για την ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-Db ριβοφουρανόζυλο]-5-φθοροουρακίλη. Και οι δύο αναστολείς είναι σημαντικά ισχυροί σε σχέση με όσους έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα υποδεικνύοντας πως η δομή τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για το σχεδιασμό νέων ισχυρών ριβονουκλεολυτικών αναστολέων.

Σχετικά με τη σημαντική διαφορά που παρουσιάζουν στις σταθερές αναστολής μπορούμε να παρατηρήσουμε πως η μόνη διαφορά στη δομή των δύο αυτών ενώσεων είναι στη θέση 5' της ουρακίλης στον υποκαταστάτη. Στη μια ένωση ο υποκαταστάτης έχει Cl και στην άλλη ένωση F. Τα δύο στοιχεία ανήκουν στην ομάδα των αλογόνων. Το F είναι πρώτο στην ομάδα των αλογόνων γεγονός που το καθιστά το πιο ηλεκτραρνητικό στην ομάδα αυτή. Εντούτοις, η μοριακή ακτίνα του χλωρίου έχει διπλάσιο μέγεθος από αυτήν του φθορίου και έτσι το χλώριο είναι κατά πολύ μεγαλύτερο. Θα μπορούσαμε λοιπόν, να υποθέσουμε πως η σύνδεση του χλωροπαραγώγου στη ριβονουκλεάση A επάγει δομικές μεταβολές οι οποίες συνεπάγονται ενεργειακό κόστος για τη σύνδεση και έτσι η σταθερά αναστολής είναι μεγαλύτερη από αυτήν του φθορίου. Για τη διαλεύκανση του τρόπου αναστολής και τη χαρτογράφηση των μοριακών δυνάμεων που διέπουν τη σύνδεση των αναστολέων στο ένζυμο θα απαιτηθούν κρυσταλλογραφικές μελέτες των συμπλόκων των αναστολέων με τη ριβονουκλεάση A.

Βιβλιογραφία

- Agelis, G., N. Tzioumaki, et al. (2007). "Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine." Bioorg Med Chem **15**(16): 5448-5456.
- Agelis, G., N. Tzioumaki, et al. (2008). "Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities." Eur J Med Chem **43**(7): 1366-1375.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (2001). "A natural classification of ribonucleases." Methods Enzymol **341**: 3-28.
- Avey, H. P., M. O. Boles, et al. (1967). "Structure of ribonuclease." Nature **213**(5076): 557-562.
- Blair, A., R. Saracci, et al. (1990). "Epidemiologic evidence on the relationship between formaldehyde exposure and cancer." Scand J Work Environ Health **16**(6): 381-393.
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010
- Bond, M. D. and B. L. Vallee (1990). "Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis." Biochemistry **29**(13): 3341-3349.
- Chatani, E. and R. Hayashi (2001). "Functional and structural roles of constituent amino acid residues of bovine pancreatic ribonuclease A." J Biosci Bioeng **92**(2): 98-107.
- Chatani, E., N. Tanimizu, et al. (2001). "Structural and functional changes in bovine pancreatic ribonuclease a by the replacement of Phe120 with other hydrophobic residues." J Biochem **129**(6): 917-922.
- Curran, T. P., R. Shapiro, et al. (1993). "Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis." Biochemistry **32**(9): 2307-2313.
- 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.

- Dostal, J. and J. Matousek (1973). "Isolation and some chemical properties of aspermatogenic substance from bull seminal vesicle fluid." J Reprod Fertil **33**(2): 263-274.
- Fairman, R., K. R. Shoemaker, et al. (1990). "The Glu 2- ... Arg 10+ side-chain interaction in the C-peptide helix of ribonuclease A." Biophys Chem **37**(1-3): 107-119.
- Fett, J. W., J. L. Bethune, et al. (1987). "Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane." Biochem Biophys Res Commun **146**(3): 1122-1131.
- Hallahan, T. W., R. Shapiro, et al. (1992). "Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the angiogenic activity of human angiogenin." Biochemistry **31**(34): 8022-8029.
- Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopaedia of life sciences 2001
- Kao, R. Y., J. L. Jenkins, et al. (2002). "A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10066-10071.
- Leatherbarrow RJ 1998. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK.
- Leland, P. A., L. W. Schultz, et al. (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10407-10412.
- Leonidas, D. D., G. B. Chavali, et al. (2003). "High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors." Protein Sci **12**(11): 2559-2574.
- Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., HO K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. Biochemical pharmacology 2010, p.79, 1772–1780. HOng B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I.,
- Manta, S., G. Agelis, et al. (2008). "Unsaturated fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto-beta-d-glucopyranosyl derivatives of N(4)-benzoyl cytosine and N(6)-benzoyl adenine." Eur J Med Chem **43**(2): 420-428.
- Moussaoui, M., M. V. Noguez, et al. (1998). "The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with cytidine 2',3'-cyclic phosphate." J Biol Chem **273**(40): 25565-25572.

- Rosenberg, H. F. (2008). "RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story." J Leukoc Biol **83**(5): 1079-1087.
- Rybak, S. M., D. S. Auld, et al. (1989). "C-terminal angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin." Biochem Biophys Res Commun **162**(1): 535-543.
- Sela, M. and C. B. Anfinsen (1957). "Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease." Biochim Biophys Acta **24**(2): 229-235.
- Shapiro, R. and B. L. Vallee (1989). "Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis." Biochemistry **28**(18): 7401-7408.
- Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. 1990. Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. J Mol Biol 214: 253-260.
- Structural Classification Of Proteins, Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. J. Mol. Biol. 247, 536-540
- Stryer, L., 1997 . Biochemistry, 3th ed. W.H. Freeman.