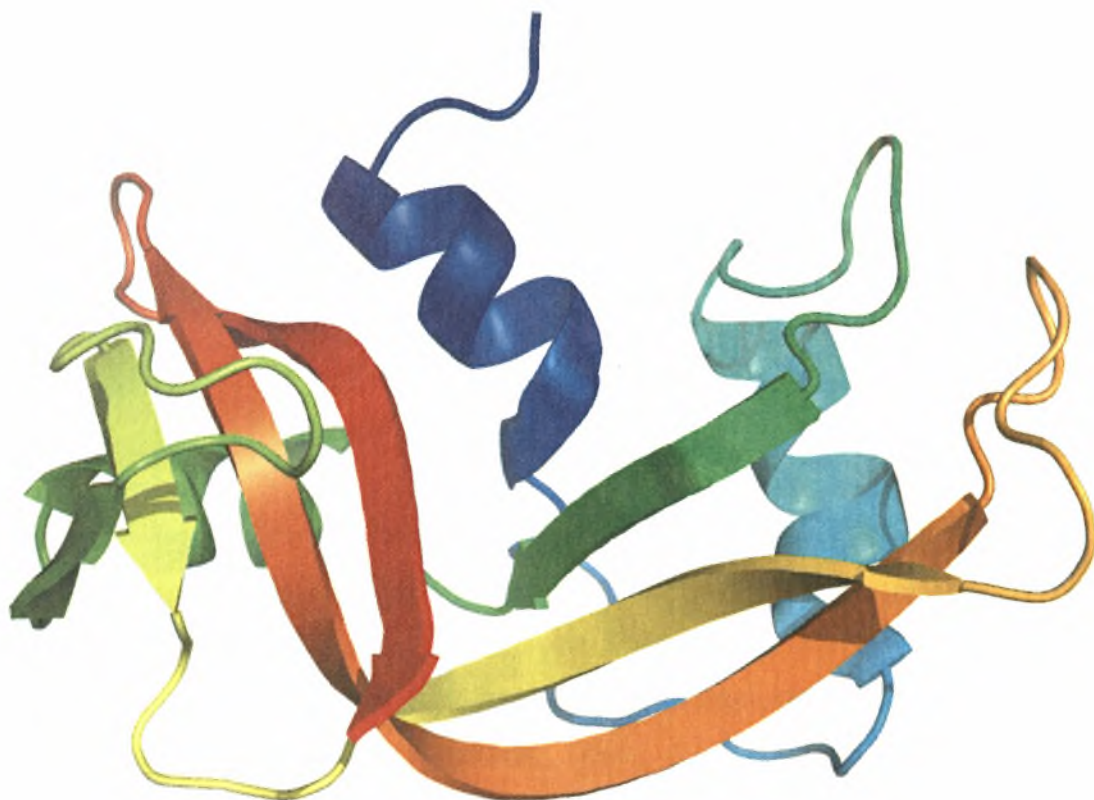




606  
25-8-09

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ  
ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α  
(RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ - ΖΕΡΒΑΚΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7659/1  
Ημερ. Εισ.: 09-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
ΖΕΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087172

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

**Κομιώτης Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,



**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,



Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Μπαλατσό για την επιλογή και ανάθεση αυτού του θέματος, καθώς επίσης και τον κ. Σταθόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με το εργαστήριο του. Οι υποδείξεις τους και οι συμβουλές τους υπήρξαν καταλυτικές για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Τέλος, πρέπει να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια τους και την υπόμονή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α (RNase A).....	4
Η δομή της RNase A.....	4
Το ενεργό κέντρο - Καταλυτική δράση.....	5
Μηχανισμός κατάλυσης της RNase A.....	7
Αναστολή της RNase A - Θεραπευτικοί στόχοι.....	10
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	12
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
Υλικά.....	13
Διαλύματα.....	14
Μέθοδοι.....	14
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	17
Πρότυπη καμπύλη RNA.....	17
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	17
Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων.....	18
Τα συνθετικά νουκλεοσίδια [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D- γλυκοπυρανοζύλ)]ουρακίλη (U1) και [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D- γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (U4) αναστέλλουν την RNase A ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	20
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	23
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	27

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α (RiboNuclease A, RNase A) από βοοειδή είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο βιοϊατρικό ενδιαφέρον καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με μια πληθώρα κακοηθειών και μολυσματικών ασθενειών. Γι αυτό το λόγο οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στο σχεδιασμό μικρών μορίων-αναστολέων με βάση τη δομή οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους. Η RNase A αποτελεί το ιδανικό μοντέλο εξαιτίας του υψηλού βαθμού συντήρησης του καταλυτικού της κέντρου με τα ομόλογα μέλη της, όπως είναι η ανθρώπινη αγγειογενίνη, (angiogenin), η οποία εμπλέκεται σε σχηματισμό όγκων στα αιμοφόρα αγγεία. Στην παρούσα εργασία σχεδιάσαμε μια σειρά από έξι συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης, με αντικαρκινική δράση, που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση και μελετήσαμε την επίδρασή τους στην δραστηριότητα της RNase A. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δύο από αυτές τις ενώσεις μείωσαν δραστικά την ενεργότητα του ενζύμου και με κινητική ανάλυση προσδιορίστηκε ότι πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Τα συνθετικά αυτά νουκλεοσίδια θα μπορούσαν να ελεγχθούν περαιτέρω για να χρησιμοποιηθούν ως αρχικά μόρια για την ανάπτυξη ενώσεων που θα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της RNase A.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Η ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ Α (RNase A)

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α (RiboNuclease A, RNase A) από βοοειδή, κατέχει εξέχουσα θέση στη μοριακή βιολογία. Ήταν το πρώτο ένζυμο και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχήθηκε, ενώ κρυσταλλογραφήθηκε πενήντα χρόνια πριν. Έχουν καθοριστεί πάνω από εκατό ομόλογα της RNase A σε όλα τα τετράποδα, ενώ πρόσφατα προσδιορίστηκε μια υπεροικογένεια RNασών στα μηρκαστικά στην οποία κατέχει εξέχουσα θέση η RNase A [1].

Η αξιοσημείωτη σταθερότητα του ενζύμου και η δυνατότητα να καθαρίζεται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες το καθιστά ένα ιδιαίτερα κατάλληλο μοντέλο για μελέτες πρωτεϊνών. Η RNase A αποτέλεσε το πρώτο μοντέλο πρωτεΐνης για πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους προσδιορισμού δομής [2]. Χρησιμοποιήθηκε από τον Christian Anfinsen για να αποδείξει ότι η αλληλουχία αμινοξέων καθορίζει τη δομή μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Οι Stanford Moore και William Stein με τη βοήθεια της RNase A, απέδειξαν ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο κάθε ενζύμου. Τέλος, ο R. Bruce Merrifield με τη χρήση αυτής της πρωτεΐνης απέδειξε ότι τα βιολογικά μόρια είναι απλές χημικές ουσίες που μπορούν να κατασκευαστούν τεχνητά. Όλες αυτές οι ανακαλύψεις χάρη στην RNase A βραβεύθηκαν με το βραβείο Nobel [3].

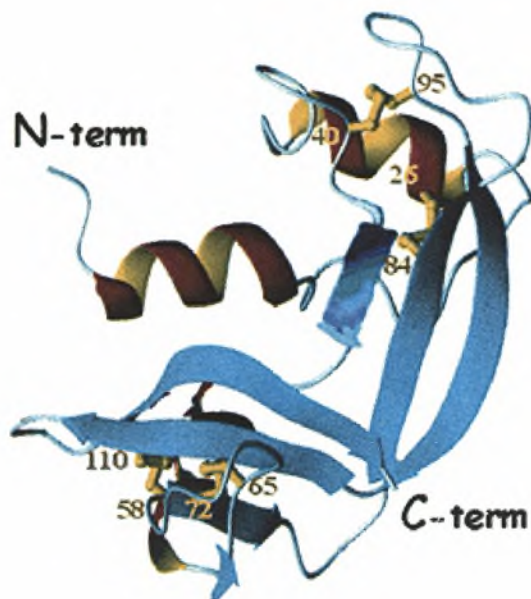
### Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ RNase A

Η RNase A είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Πρόκειται για μία πολύ μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 13.686 Da, ενώ η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά [4].

Η δευτεροταγής δομή της RNase A αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά αντιπαράλληλα β-φύλλα, ενώ σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

δεσμοί μεταξύ των εξής καταλοίπων Cys : 26-84, 40-95, 58-110, 67-72. Συγκεκριμένα, οι δεσμοί 26-84 και 58-110 συμβάλλουν ιδιαίτερα στη σταθερότητα του ενζύμου [4,5]. Το N-τελικό άκρο περιλαμβάνει μια α-αλυσίδα, ενώ συνδέεται με το κύριο σώμα της πρωτεΐνης με έναν ευκίνητο βρόχο. Το C-τελικό άκρο σχηματίζει μια φουρκέτα που αποτελείται από δύο β-φύλλα και περιέχει κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα σε αντίθεση με το N-τελικό άκρο. Στην Εικόνα 1 παρατίθεται η δομή της RNase A.



**Εικόνα 1:** Η δομή της παγκρεατικής RNase A. Οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί του ενζύμου (26–84, 40–95, 58–110 και 65–72) φαίνονται με κίτρινες ράβδους.

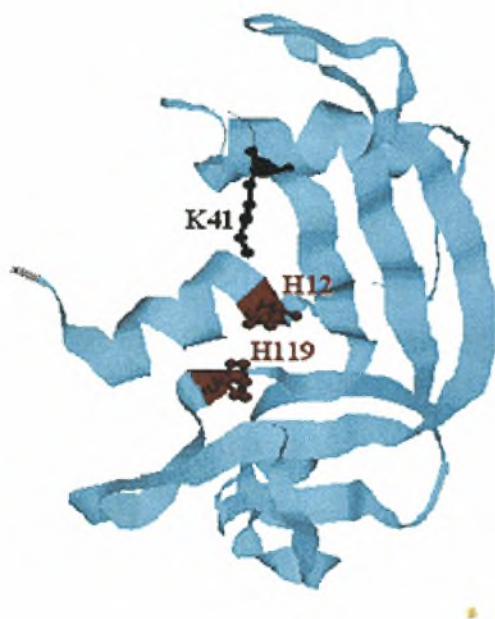
### ΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ RNase A – ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθούνται από γουανίνη. Επίσης, έχει προτίμηση για πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες όπως είναι το mRNA παρά για ολιγονουκλεοτίδια [6].

Το ενεργό κέντρο της RNase A σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: την His 12, την His 119 και τη Lys 41. Οι δύο His, όπως περιγράφεται παρακάτω, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού,

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Αντικατάσταση των His 12 και His 119 από κατάλοιπα Asp 12 ή Glu 12 και Asp 12 αντίστοιχα, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, αλλά και την αποσταθεροποίησή του, γεγονός που αποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο των δύο αυτών καταλοίπων στη λειτουργία της ενδονουκλεάσης [7]. Στην Εικόνα 2 που ακολουθεί φαίνεται η καταλυτική τριάδα της RNase A με κόκκινες και μαύρες ράβδους.



**Εικόνα 2:** Η καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου της RNase A με κόκκινες και μαύρες ράβδους.

Ένα όχι πρωτεύον αλλά εξίσου σημαντικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου είναι η Thr 45. Το κατάλοιπο αυτό δεν 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 [8]. Συγκεκριμένα, η Thr 45 έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μία κυτοσίνη ή ουρακίλη του ενεργού κέντρου του συνδεδεμένου υποστρώματος. Αυτοί οι δεσμοί επηρεάζουν την προτίμηση 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) [9-12].



## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

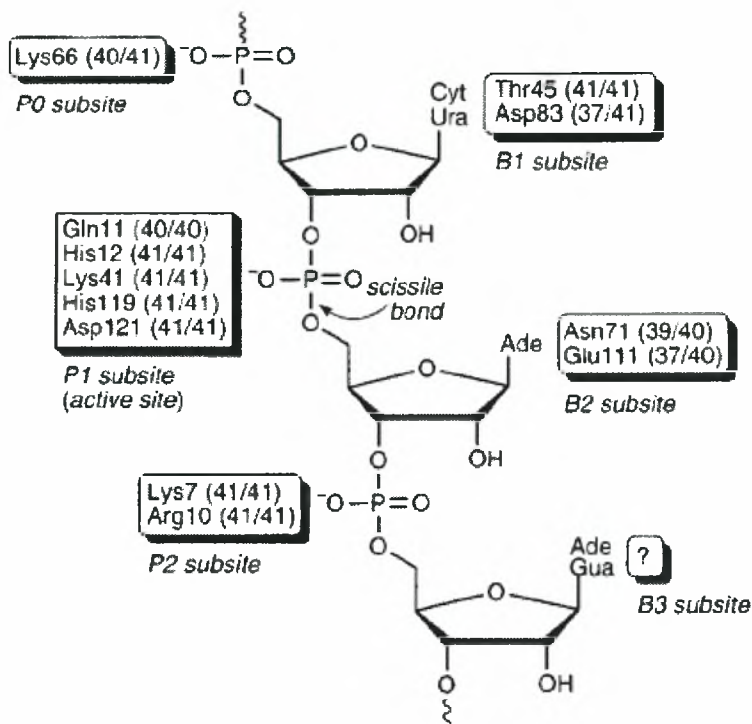
Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την πρόσδεση του υποστρώματος. Υπάρχουν κατάλοιπα σε μη καταλυτικές υπομονάδες της RNase A που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του υποστρώματος [13,14]. Έτσι εκτός από την υπομονάδα  $p_1$  που αποτελεί το ενεργό κέντρο, υπάρχουν δύο ακόμα μη καταλυτικές υπομονάδες, η  $p_2$  που περιλαμβάνει τα βασικά κατάλοιπα Lys 7 και Arg 10 και η  $p_0$  που περιλαμβάνει τη Lys 66. Η  $p_2$  προσδέεται στις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής, ενώ η  $p_0$  προσδέεται στις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης. Αυτές οι θέσεις πρόσδεσης διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην καταλυτική διαδικασία της RNase A. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της υπομονάδας  $p_2$  είναι σημαντικές τόσο στην κατάλυση όσο και στην δραστικότητα ενδονουκλεάσης, ενώ η υπομονάδα  $p_0$  συνεισφέρει μόνο στην πρόσδεση του RNA [15-17]. Ακολουθεί μια σχηματική αναπαράσταση του προσδεμένου συμπλόκου με τη συμμετοχή τόσο του ενεργού κέντρου όσο και των μη καταλυτικών υπομονάδων (Εικόνα 3).

### ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ RNase A

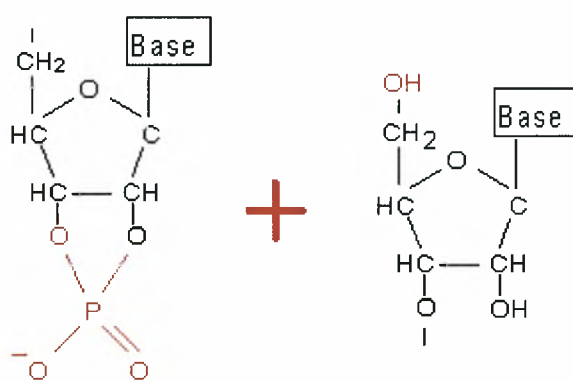
Όπως προαναφέρθηκε, τα δύο κατάλοιπα His του ενεργού κέντρου της RNase A διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη δραστικότητα ενδονουκλεάσης του ενζύμου. Ο μηχανισμός κατάλυσης περιλαμβάνει δύο στάδια: μια αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδας (transphosphorylation) και μία αντίδραση υδρόλυσης [19,20].

Στην πρώτη αντίδραση η His 12 λειτουργεί ως βάση που αποσπά ένα πρωτόνιο από τη 2'-OH ομάδα του υποστρώματος. Στη συνέχεια η 2'-O λειτουργεί ως πυρηνόφιλο και επιτίθεται στο θετικά φορτισμένο άτομο του φωσφόρου σχηματίζοντας ένα 2'-3' κυκλικό ριβονουκλεοτιδικό φωσφορικό ενδιάμεσο, ενώ ταυτόχρονα εκτοπίζει ένα νουκλεοτίδιο (Εικόνα 4). Η δημιουργία αυτού του ενδιάμεσου διευκολύνεται από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της His 119, η οποία λειτουργεί ως οξύ και δίνει το πρωτόνιο της στο άτομο του οξυγόνου του δεσμού που κόβεται [21,22].

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**



**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος [18]. Το B αντιπροσωπεύει τις καταλυτικές υπομονάδες, με τη B<sub>1</sub> να έχει προτίμηση στις πυριμιδίνες και την B<sub>2</sub> στις πουρίνες. Τέλος, το P<sub>1</sub> είναι το ενεργό κέντρο και τα P<sub>2</sub> και P<sub>0</sub> οι μη καταλυτικές υπομονάδες.

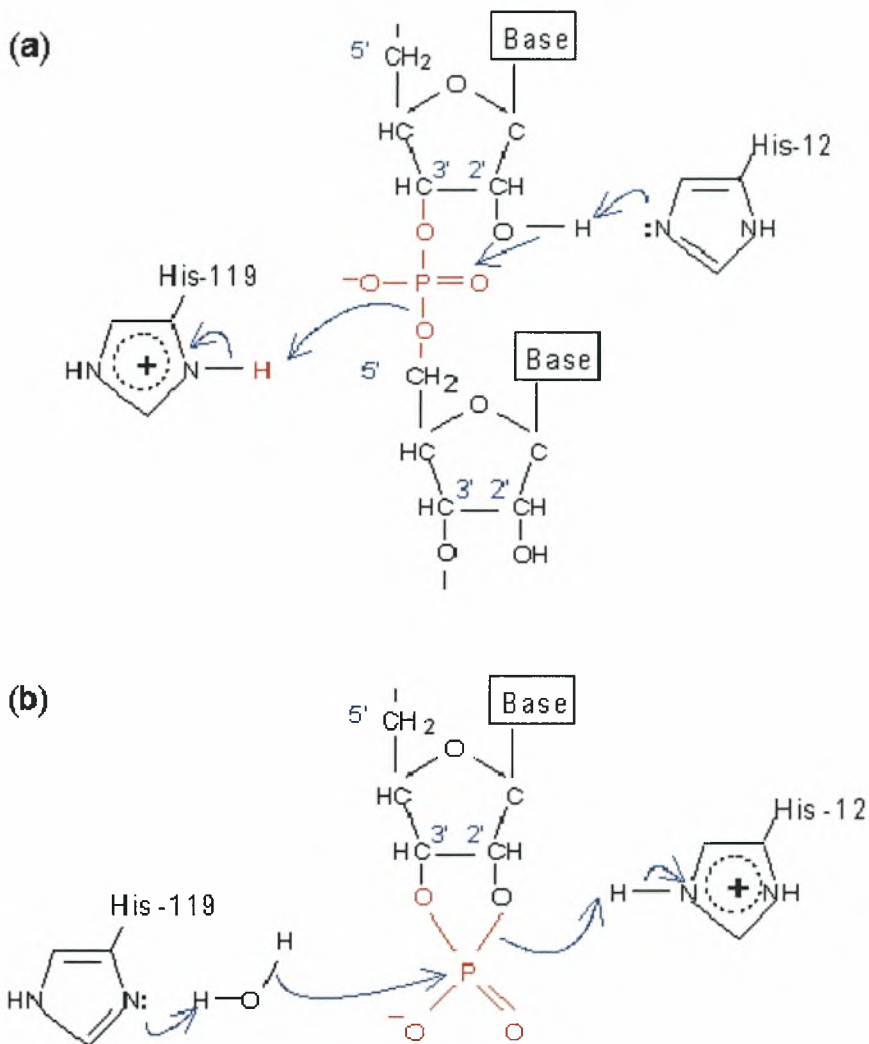


**Εικόνα 4:** Το ενδιάμεσο μεταβολικό προϊόν της πρώτης αντίδρασης.

Στην αντίδραση της υδρόλυσης οι ρόλοι των δύο καταλοίπων His αναστρέφονται. Έτσι, εδώ η His 12 δρά ως οξύ, δίνοντας το πρωτόνιο που έλαβε στο πρώτο στάδιο στο φωσφορικό ενδιάμεσο, ενώ η His 119 δρώντας

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ A (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΘΕΙΔΗ.**

ως βάση λαμβάνει ένα πρωτόνιο από το H<sub>2</sub>O και προάγει την υδροξυλίωση του μεταβολικού ενδιάμεσου. Στη συνέχεια τα δύο προϊόντα απελευθερώνονται στο διάλυμα. Στην Εικόνα 5 παρατίθεται η διαδικασία των δύο σταδίων.



**Εικόνα 5:** Ο καταλυτικός μηχανισμός της RNase A. (a) Στο πρώτο στάδιο, με τη συμβολή των δύο καταλοίπων His αποσπάται ένα πρωτόνιο από τη 2'-OH ομάδα του υποστρώματος και στη συνέχεια προσβάλλει το φωσφοδιεστερικό δεσμό δημιουργώντας ένα μεταβολικό ενδιάμεσο. (b) Ακολουθεί το στάδιο της υδρόλυσης του ενδιάμεσου με την απόσπαση ενός πρωτονίου από το H<sub>2</sub>O.

## ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ RNase A – ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

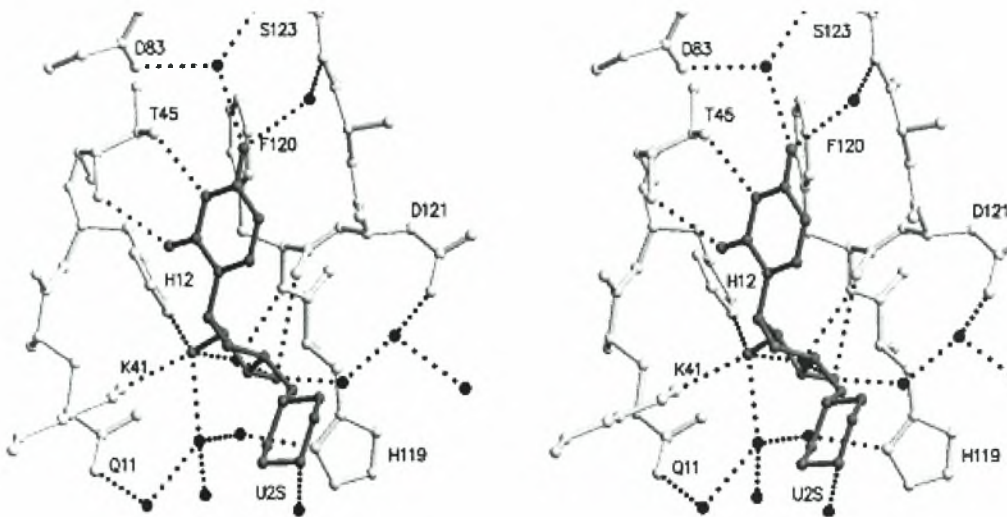
Πολλά μέλη της υπεροικογένειας της RNase A έχουν δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα από τη χρήση τους ως αντικαρκινικά φάρμακα. Η RNase A είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξική και σε παλαιότερες κλινικές μελέτες αποτέλεσε στόχο χημειοθεραπείας. Το 1955 μικρή ποσότητα της ενέθηκε σε ποντίκια με όγκο και παρατηρήθηκε ότι εμπόδισε την ανάπτυξη του όγκου [23,24]. Λίγα χρόνια αργότερα, χρησιμοποιήθηκε σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Σε ασθενείς με χρόνια μυελοκατασταλτική λευχαιμία παρατηρήθηκε μείωση στο μέγεθος της σπλήνας και γενικότερη βελτίωση μετά από υποδερμική χορήγηση RNase A [25].

Την τελευταία δεκαετία, μέλη της υπεροικογένειας της RNase A έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο βιοϊατρικό ενδιαφέρον καθώς οι βιολογικές δραστηριότητές τους σχετίζονται με μια πληθώρα κακοηθειών και μολυσματικών ασθενειών [26]. Έρευνες έδειξαν ότι οι περισσότερες παθολογικές καταστάσεις συνδέονται με την ενδοριβονουκλεολυτική δραστικότητα αυτών των πρωτεϊνών [27-35]. Γι αυτό το λόγο αναστολείς της ενζυμικής τους δραστικότητας θα μπορούσαν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους [36]. Ο σχεδιασμός μικρών μορίων-αναστολέων με βάση τη δομή έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην RNase A εξαιτίας του υψηλού βαθμού συντήρησης του καταλυτικού της κέντρου με τα ομόλογα μέλη της, όπως είναι η ανθρώπινη αγγειογενίνη, (angiogenin). Η αγγειογενίνη, αποτελεί έναν επαγωγέα σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων *in vivo* [37], ενώ έχειδειχθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στην αναγνώριση και στη μεταστατική διάδοση όγκων στα ποντίκια [38,39]. Επίσης, από έρευνες έχει προκύψει ότι οι RNase 2 και RNase 3 έχουν κοινές αμυντικές δραστηριότητες [40-42], αλλά είναι επίσης νευροτοξικές και μπορεί να εμπλέκονται σε ανάλογες ασθένειες [43-45].

Μέχρι τώρα, έχει μελετηθεί η πρόσδεση μονονουκλεοτιδικών και δινουκλεοτιδικών αναλόγων υποστρωμάτων, [46-48], με την πλειονότητα των αναστολέων να έχουν όξινες ομάδες όπως φωσφορικού ή θειϊκού άλατος [48,49]. Όλα αυτά τα συνθετικά νουκλεοτίδια προσδένονται καθλώνοντας το

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

φωσφορικό ή θειϊκό άλας στην κεντρική υπομονάδα  $p_1$  του ενζύμου [47,50]. Πιο πρόσφατα, μια νέα τάξη ανάλογων νουκλεοτιδίων αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της RNase A [51]. Πρόκειται για έξι 5' –δεόξυ- 5' μορφόλινο, πιπερίδινο και πυρολίδινο ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης, τα οποία ακολουθούν κινητική συναγωνιστικής αναστολής με  $K_i$  103  $\mu$ M. Η μελέτη με κρυσταλλογραφία με ακτίνες έδειξε πως όλοι οι αναστολείς προσδένονται στην RNase A καθλώνοντας τη φωσφορική τους ομάδα μακριά από το ενεργό κέντρο  $p_1$  και κοντά στην υπομονάδα  $p_0$ , δείχνοντας έτσι ότι μικρές τροποποιήσεις στη χημική δομή του αναστολέα μπορούν να δημιουργήσουν ριζικές μεταβολές στις αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη στόχο. Στην Εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται αυτή η διαφορετική πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο της RNase A. Η χρήση συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων δεν είναι τυχαία, καθώς έχει δειχθεί πως έχουν αντικαρκινική και αντι-ϊική δράση και για ορισμένα από αυτά έχει βρεθεί πως ένας τουλάχιστον μοριακός στόχος είναι μια εξωριβονουκλεάση [52].



**Εικόνα 6:** Στερεοδιάγραμμα που απεικονίζει τις αλληλεπιδράσεις ενός αναστολέα με την RNase A. [51].

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αξιοσημείωτη σταθερότητα καθώς και η ευκολία καθαρισμού της, έχουν καταστήσει την RNase A ιδανικό μοντέλο για την μελέτη πρωτεϊνών. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου με άλλα μέλη της υπερικογένειας, όπως η αγγειογενίνη που σχετίζεται με πληθώρα κακοηθειών, έχει οδηγήσει στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων, όπως συνθετικά νουκλεοσίδια, που αναστέλλουν δραστικά την RNase A. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως ορισμένα συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντικαρκινική και αντι-ιϊκή δράση αναστέλλουν την ανθρώπινη PARN [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]. Η τελευταία έχει υψηλή εξειδίκευση για την πολύ(A) ουρά του mRNA, όπως και η RNase A αν και μικρότερη της PARN.

Σκοπός μας είναι να εξετάσουμε αν τα ανάλογα της οικογένειας που αναστέλλουν την PARN έχουν επίδραση στη δραστικότητα της RNase A. Απώτερος στόχος είναι να εξεταστεί αν οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν έναν ευρύτερο στόχο σχεδιασμού ενώσεων με πιθανή χρήση έναντι παθολογικών καταστάσεων.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Υλικά

#### Χημικά

Diethylpyrocarbonat ( <i>DEPC</i> )	Research Organics
Dithiothreitol ( <i>DTT</i> )	SERVA
EDTA	Panreac
HCl	Merck
KCl	Merck
KOH	Merck
MOPS	Alfa Aesar
Tris base	Merck
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen

#### Πρωτεΐνες , νουκλεϊκά οξέα και ένζυμα

RNase A	SIGMA
Yeast RNA	SIGMA

#### Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια

[1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]ουρακίλη (U1),

[1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU1),

[1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]ουρακίλη (U2),

[1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU2),

[1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]θυμίνη (T1) και

[1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]θυμίνη (T2)

παραχωρήθηκαν από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Κομιώτη,  
(Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

## Διαλύματα

**Διαλύματα για την μέτρηση της ενεργότητας της RNase A σύμφωνα με το άρθρο [53].**

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, ο/η και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)
- Διάλυμα αντίδρασης (Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 50mM, pH 7,5)
- Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH pH7,5, 2mM EDTA)
- Διάλυμα RNA 0,29μg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης RNA (4mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης.
- Διάλυμα EDTA (Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 50mM, pH 7,5, 2mM EDTA)
- Διάλυμα KCl (Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 50mM, pH 7,5, 100mM KCl)
- Διάλυμα DTT (Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 50mM, pH 7,5, 0,25mM DTT)
- Διάλυμα Β-μερκαπτοαιθανόλης (Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 50mM, pH 7,5, 0,142M Β-μερκαπτοαιθανόλης)

## Μέθοδοι

**Μέτρηση της ενεργότητας της RNase A με κυανό του μεθυλενίου**

### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης του RNA στα 688nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [53]. Στην αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο RNA.



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

Μείωση της συγκέντρωσης του RNA, που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι για την μέτρηση της ενεργότητας προστίθεται ίδια ποσότητα RNA στο τυφλό και στην αντίδραση όπου η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας RNA που αποικοδομήθηκε.

**Κατασκευή πρότυπης καμπύλης RNA**

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15min στους 37°C και η φωτομέτρηση έγινε στα 688nm. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (Δ.A). Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την ποσότητα του RNA που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

**Πίνακας 1:** Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Τελική συγκέντρωση RNA (μg/ml)	10	20	50	100	200	300
RNA 1mg/ml και 3,7mg/ml (μl)	10	20	50	27	54	81
Διάλυμα αντίδρασης (μl) και διαλύματα EDTA,DTT και KCl	90	80	50	73	46	19
διάλυμα κυανού του μεθυλενίου(μl)	900	900	900	900	900	900

**Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης**

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C. Για να υπολογίσουμε τον βέλτιστο χρόνο αντίδρασης και την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου, εκτελούμε πειράματα ενζυμικής δράσης κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, η αντίδραση σταματά με προσθήκη του

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 688nm.

*Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις RNA*

Έχοντας υπολογίσει με πειράματα χρονοκαμπύλης την ποσότητα του ενζύμου και τον απαιτούμενο χρόνο αντίδρασης ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της χρονοκαμπύλης μπορούμε να κατασκευάσουμε καμπύλη Michaelis-Menten με συγκεντρώσεις RNA 10,30,75,150  $\mu\text{g/ml}$ .

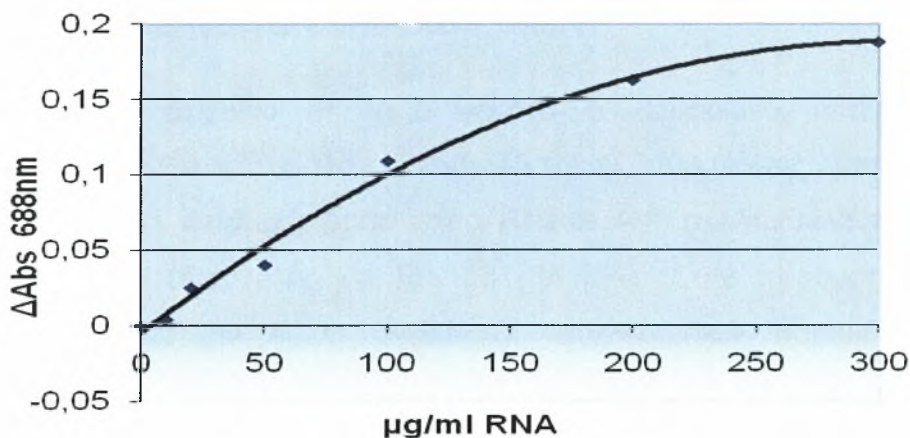
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Πρότυπη καμπύλη RNA

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης RNA ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15min στους 37°C, που είναι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται και η αντίδραση της RNase A, και η φωτομέτρηση έγινε στα 688nm. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης ( $\Delta A$ ). Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει μια πολυωνυμική σχέση με εξίσωση:

$$A = - 2 \cdot 10^{-6} \cdot C^2 (\mu\text{g/mL}) + 0,0013 \cdot C - 0,0044$$

Με τη συγκεκριμένη εξίσωση θα μετατραπούν οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε RNA που αποικοδομήθηκε κατά τις αντιδράσεις. Στην Εικόνα 7 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη RNA.



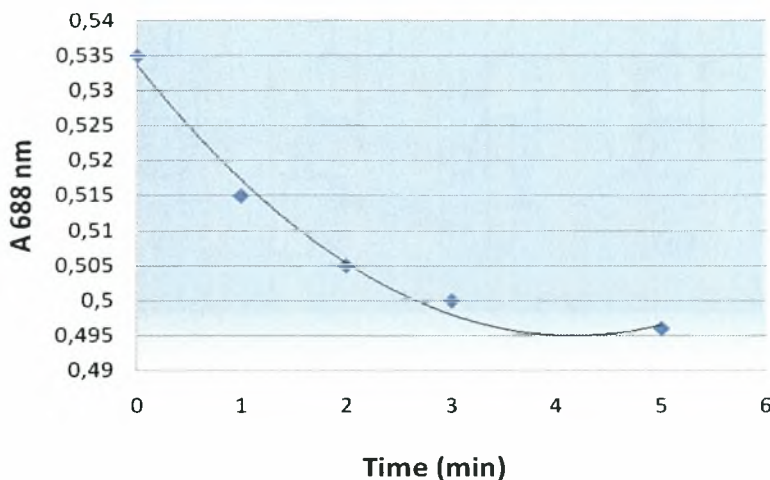
Εικόνα 7: Πρότυπη καμπύλη RNA με χρήση κυανού του μεθυλενίου

### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία [53], καθορίστηκε ως ιδανική συγκέντρωση ενζύμου για τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματα τα 0,29μg/ml και ελάχιστος χρόνος αντίδρασης 1min για την RNase A. Η

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

συγκέντρωση RNA είναι 75μg/ml για να είναι εντός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου. Η χρονοκαμπύλη της ενζυμικής δράσης της RNase A παρατίθεται στην εικόνα 8:



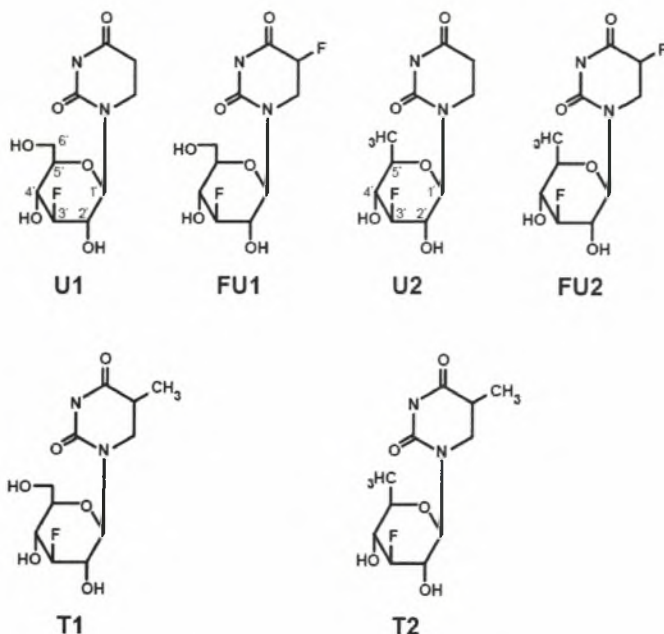
**Εικόνα 8:** Χρονοκαμπύλη της ενζυμικής δράσης της RNase A (0,29μg/ml) σε συγκέντρωση RNA 75μg/ml.

### Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων.

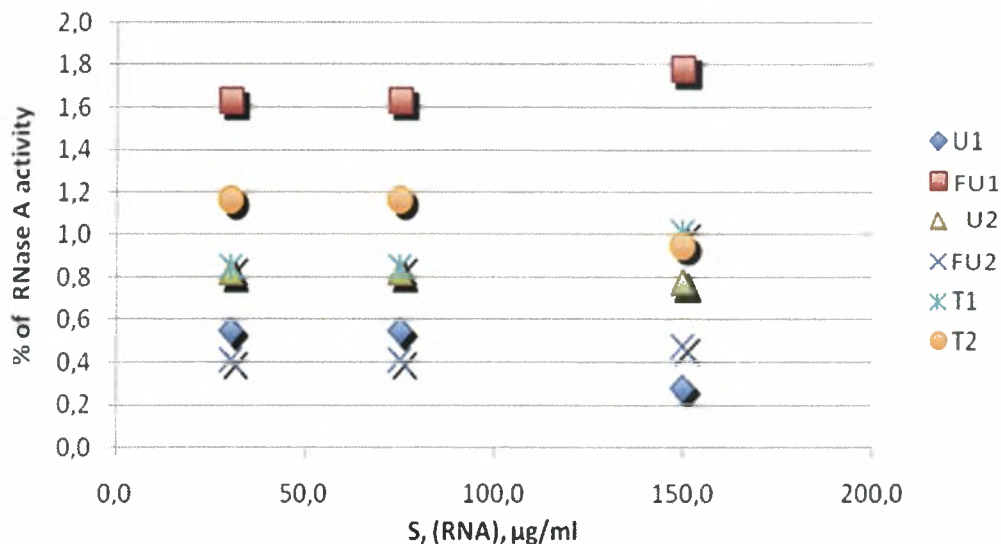
Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα 5' -δεόξυ- 5' μορφόλινο, πιπερίδιο και πυρολίδιο συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης μπορούν να αναστείλουν την ενζυμική δράση της RNase A , ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής με  $K_i$  103  $\mu$ M [51]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε μια σειρά αναλόγων νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση, τα οποία παρατίθενται στην Εικόνα 9. Ειδικότερα, φέρουν εξαμελή δακτύλιο γλυκοπυρανόζης ως σάκχαρο με προσθήκη ενός ατόμου φθορίου. Ενώσεις με τις τροποποιήσεις αυτές έχουν αναφερθεί να εκδηλώνουν αντικαρκινική και αντι-ϊική δράση [54]. Μελετήσαμε την επίδρασή τους στην ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου στο πρώτο λεπτό αντίδρασης και παρατηρήσαμε, σύμφωνα με το διάγραμμα που απεικονίζεται στην Εικόνα 10, ότι δύο εκ των ενώσεων, οι [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλλ)]ουρακίλη (U1) και [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU2), μείωσαν σημαντικά τη

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

δραστικότητα της RNase A. Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου.



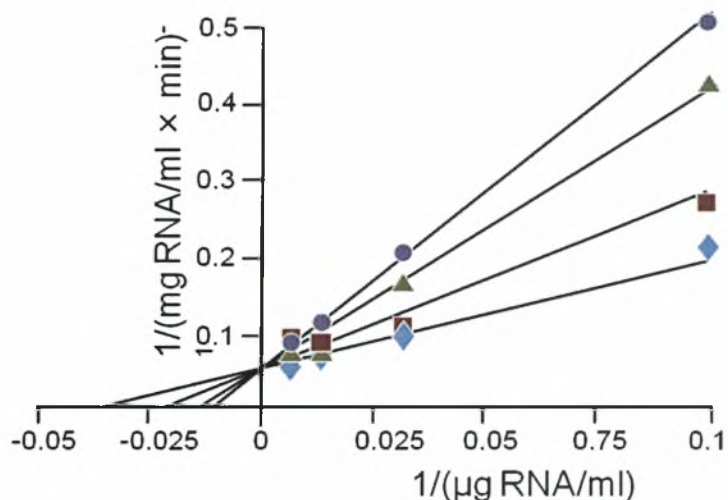
**Εικόνα 9:** Δομή των συνθετικών νουκλεοσιδίων που μελετήθηκαν στην εργασία.



**Εικόνα 10:** Επίδραση συνθετικών νουκλεοσιδίων στην ενεργότητα της RNase A. Χρόνος αντίδρασης 1', συγκεντρώσεις RNA 30,75 και 150 µg/ml.

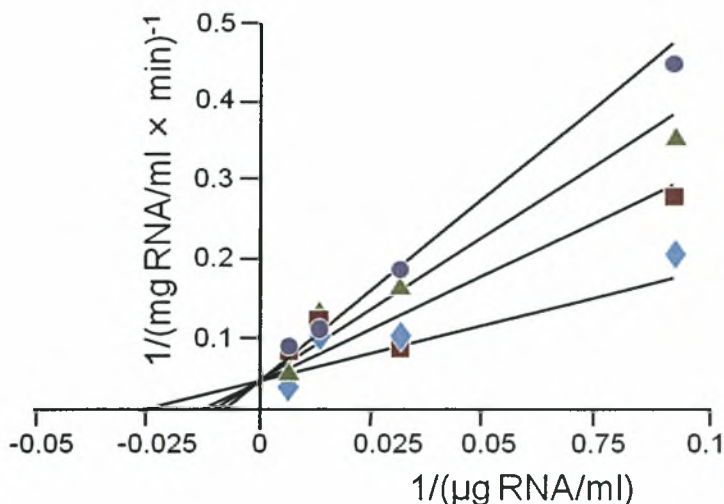
## Τα συνθετικά νουκλεοσίδια U1 και FU2 αναστέλλουν την RNase A ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της RNase A από τα συνθετικά νουκλεοσίδια [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]ουρακίλη (U1) και [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU2) πραγματοποιήσαμε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων. Με πειράματα χρονοκαμπύλης υπολογίσαμε τη ποσότητα του ενζύμου στα 0,29  $\mu\text{g/ml}$  καθώς επίσης και το χρόνο αντίδρασης του ενζύμου στο 1min, ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της χρονοκαμπύλης. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα Lineweaver-Burk έδειξε ότι τόσο το U1 όσο και το FU2 παρουσιάζουν κινητική συναγωνιστικής αναστολής όπως φαίνεται και στην Εικόνες 11 και 12.



**Εικόνα 11:** Κινητική μελέτη της αναστολής της RNase A παρουσία U1. Διάγραμμα διπλού ανάστροφου  $1/V - 1/S$  παρουσία 0  $\mu\text{M}$  (γαλάζιος ρόμβος), 10  $\mu\text{M}$  (καφέ τετράγωνο), 100  $\mu\text{M}$  (πράσινο τρίγωνο) και 500  $\mu\text{M}$  (μώβ κύκλος) U1.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**



**Εικόνα 12:** Κινητική μελέτη της αναστολής της RNase A παρουσία FU2. Διάγραμμα διπλού ανάστροφου  $1/V - 1/S$  παρουσία 0  $\mu\text{M}$  (γαλάζιος ρόμβος), 10  $\mu\text{M}$  (καφέ τετράγωνο), 100  $\mu\text{M}$  (πράσινο τρίγωνο) και 500  $\mu\text{M}$  (μώβ κύκλος) FU2.

Για να προσδιορίσουμε τις σταθερές αναστολής ( $K_i$ ) κινητικά χρησιμοποιήθηκαν η κλίση των ευθειών των παραπάνω διαγραμμάτων, καθώς και οι συγκεντρώσεις των νουκλεοσιδίων (10, 100 και 500 $\mu\text{M}$ ). Σύμφωνα με τα παραπάνω προέκυψαν οι τιμές  $K_i$  για το U1 και του FU2 (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Οι σταθερές αναστολής για τις ενώσεις U1 και FU2 .

Συνθετικά νουκλεοτίδια	$K_i$ , $\mu\text{M}$
<b>U1</b>	487
<b>FU2</b>	627

Σε αυτό το σημείο να αναφέρουμε ότι η κινητική ανάλυση που έγινε για τα συνθετικά ανάλογα [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU1) και [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)] ουρακίλη (U2), που αποτελούνται από μια φθορο-ουρακίλη και μία

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

υδροξυλομάδα ή μια ουρακίλη και μία μεθυλομάδα προσκολλημένες σε ένα δακτύλιο γλυκοπυρανόζης, αντίστοιχα, έδειξε ότι οι συγκεκριμένες ουσίες δεν έχουν καμία επίδραση στην RNase A και δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 10). Ανάλογα αποτελέσματα έδειξαν και τα συνθετικά ανάλογα [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]θυμίνη (T1) και [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]θυμίνη (T2) τα οποία αποτελούνται από μια υδροξυλομάδα και μια θυμίνη ή μια μεθυλομάδα και μια θυμίνη προσκολλημένη σε ένα δακτύλιο γλυκοπυρανόζης, αντίστοιχα.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η RNase A έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική της δραστικότητα σχετίζεται με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης του ενεργού κέντρου της RNase A με ανθρώπινα ομολογά της, όπως η αγγειογενίνη οδήγησε στο σχεδιασμό μικρών μορίων - αναστολέων με βάση τη δομή, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους.

Μέχρι τώρα, έχει μελετηθεί η πρόσδεση μονονουκλεοτιδικών και δινουκλεοτιδικών αναλόγων υποστρωμάτων, ενώ πιο πρόσφατα αναγνωρίστηκε μια νέα τάξη αναλόγων νουκλεοτιδίων ως αναστολείς της RNase A με διαφορετικό μηχανισμό αναστολής. Πρόκειται για 5' -δεόξυ- 5' μορφόλινο, πιπερίδινο και πυρολίδινο συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ενζυμική δράση της RNase A, ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής με σταθερά αναστολής 103  $\mu\text{M}$  [51].

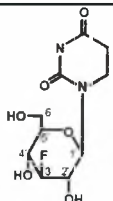
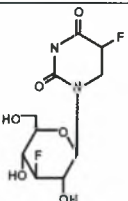
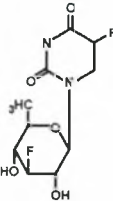
Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε έξι ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση και μελετήσαμε την επίδρασή τους στη δραστικότητα της RNase A. Μελέτες έχουν δείξει ότι κάποια συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων έχουν αντικαρκινική και αντι-ιϊκή δράση και για ορισμένα από αυτά έχει βρεθεί τουλάχιστον ένας μοριακός στόχος. Σκοπός μας είναι να εξετάσουμε αν στοχεύουν και σε άλλες ριβονουκλεάσες, ώστε να εξεταστεί αν οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν γενικά στόχο νέων ουσιών με πιθανό κλινικό ενδιαφέρον. Στην εργασία μας, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την RNase A για λόγους που προαναφέρθηκαν (βλ. Εισαγωγή).

Οι τέσσερις από αυτές τις χημικές ενώσεις που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασαν κάποια επίδραση στην RNase A. Δύο όμως, η [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]ουρακίλη (U1) και η [1-(3',6'-διδεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλ)]5-φθόρο-ουρακίλη (FU2), παρουσίασαν μια σημαντική μείωση στην καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου. Η U1 αποτελείται από μία ουρακίλη και μία υδροξυλομάδα προσκολλημένες σε ένα δακτύλιο

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΘΕΙΔΗ.**

γλυκοπυρανόζης, ενώ η FU2 αποτελείται από μια φθορο-ουρακίλη και μία μεθυλομάδα προσκολλημένες στο δακτύλιο γλυκοπυρανόζης. Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για να προσδιοριστεί το είδος της αναστολής και τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν ότι πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή με σταθερές αναστολής 487  $\mu\text{M}$  για το U1 και 627  $\mu\text{M}$  για το FU2. Το U1 φαίνεται να είναι δραστικότερος αναστολέας της RNase A από το FU2, παραμένουν όμως αρκετά πιο ασθενείς από άλλα συνθετικά ανάλογα πυριμιδίνης με  $K_i$  103  $\mu\text{M}$  [51], γεγονός που αποδεικνύει ότι μικρές αλλαγές στη δομή των μορίων μπορούν να παρουσιάσουν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις με το ένζυμο στόχο. Στον Πίνακα που ακολουθεί συγκρίνονται οι σταθερές αναστολής για την RNase A με αυτές της PARN παρουσία των συνθετικών αναλόγων U1, FU1 και FU2. Παρατηρούμε ότι ο U1 αναστέλλει σαφώς πιο δραστικά την PARN από την RNase A, ενώ ο FU2 δεν επηρεάζει καθόλου την δραστικότητα της ενώ μειώνει αυτή της RNase A.

**Πίνακας 3:** Σταθερές αναστολής για την RNase A και την PARN, παρουσία συνθετικών αναλόγων.

Νουκλεοσίδιο	$K_i$ , $\mu\text{M}$	
	RNase A	PARN
U1 	487	20
FU1 	-	135
FU2 	627	-

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.**

Η διαπίστωση πως συνθετικά μόρια, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μπορούν να ρυθμίσουν τη δράση του ενζύμου μπορεί να καταστήσει το ένζυμο στόχο για ουσιών με κλινικό ενδιαφέρον. Όπως προαναφέρθηκε, ουσίες όπως αυτές που χρησιμοποιήσαμε, έχουν αντικαρκινική και αντι-ϊική δράση. Η παρούσα εργασία στην αναστολή της RNase A, καθώς και άλλες μελέτες μας στην εξοριβονουκλεάση PARN, δείχνει πως τα ανάλογα των νουκλεοσιδίων που χρησιμοποιούμε θα μπορούσαν να λειτουργούν ως αναστολείς ριβονουκλεασών γενικότερα. Αν και χρειάζονται αρκετές ακόμη μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, φαίνεται πως παράγοντες που ρυθμίζουν τη σταθερότητα του RNA, όπως οι ριβονουκλεάσες, μπορούν να αποτελέσουν κοινό στόχο των συνθετικών νουκλεοσιδίων. Τα τελευταία θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως πλατφόρμα για ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μορίων στο μέλλον.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pizzo E. and D'Alessio G. (2007)  
The success of the RNase scaffold in the advance of biosciences and in evolution 406: 8-12
2. Dickson K.A., Haigis, M.C., Raines R.T. (2005)  
Ribonuclease inhibitor: Structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research* 80: 349-374.
3. Marshall, G. R , Feng J. A., Kuster D. J. (2007)  
Back to the future:Ribonuclease A. *Peptide Science* 90: 259-277.
4. Raines, R.T (1998)  
Ribonuclease A. *Chem Rev* 98, 1045-1065.
5. Klink, T. A., Woycechowsky, K. J., Taylor, K. M. and Raines, R. T. (2000)  
Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A.
6. Nogués MV, Vilanova M, Cuchillo CM. (1995)  
Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites.
7. Naoki Tanimizu, Hiroshi Ueno and Rikimaru Hayashi (2002)  
Replacement of His12 or His119 of bovine pancreatic ribonuclease A with acidic amino acid residues for the modification of activity and stability.
8. Bradley R. Kelemen, L. Wayne Schultz, Rozamond Y. Sweeney and Ronald T. Raines. (2000)  
Excavating an Active Site: The Nucleobase Specificity of Ribonuclease A.
9. Wlodawer, A., Miller, M., and Sjölin, L. (1983)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3628-3631.
10. Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Palmer, R., and Wyns, L. (1994)  
*Protein Sci.* 3, 2322-2339.
11. delCardayre´, S. B., and Raines, R. T. (1994)  
*Biochemistry* 33, 6031-6037.
12. delCardayre´, S. B., and Raines, R. T. (1995)  
*J. Mol. Biol.* 252, 328-336.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

13. Nogue'sa M. V., Moussaouia M., Boixa E., Vilanovab M., Ribo'b M. and Cuchilloa C. M. (1998)  
The contribution of noncatalytic phosphate-binding subsites to the mechanism of bovine pancreatic ribonuclease A.
14. Moussaoui, M., Guasch, A., Boix, E., Cuchillo, C.M., and Nogués, M.V. (1996)  
The role of non-catalytic binding subsites in the endonuclease activity of bovine pancreatic ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 271: 4687–4692.
15. Parés, X., Llorens, R., Arús, C., and Cuchillo, C.M. (1980).  
The reaction of bovine pancreatic ribonuclease A with 6-chloropurine riboside 5'monophosphate. Evidence on the existence of a phosphate-binding sub-site. *Eur. J. Biochem.* 105: 571–579.
16. Parés, X., Nogués, M.V., de Llorens, R., and Cuchillo, C.M. (1991).  
Structure and function of ribonuclease A binding subsites. In *Essays in biochemistry* (ed. K.F. Tipton). Vol. 26, pp. 89–103. Portland Press Ltd., London
17. Cuchillo, C.M., Moussaoui, M., Barman, T., Travers, F., and Nogués, M.V. (2002).  
The exo- or endonucleolytic preference of bovine pancreatic ribonuclease A depends on its subsites structure and on the substrate size. *Protein Sci.* 11: 117–128.
18. Richards F. M. and Wyckoff H. W. (1971)  
Bovine pancreatic ribonuclease. In: *The Enzymes*, vol. 4, pp. 647–806, Boyer P.D. (ed.), Academic Press, New York
19. Molecular Biology Web Book, Chapter 3 :Catalytic mechanisms of enzymes (web-books.com)
20. Raines, R.T. (2004).  
Active site of ribonuclease A. In *Nucleic acids and molecular biology: Artificial nucleases* (ed. M.A. Zenkova). Vol. 13, pp. 19–32. Springer-Verlag, Berlin.
21. Boix, E., Nogués, M.V., Schein, C.H., Benner, S.A., and Cuchillo, C.M. (1994).  
Reverse transphosphorylation by ribonuclease A needs an intact p<sub>2</sub>-binding site. Point mutations at Lys-7 and Arg-10 alter the catalytic properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 2529–2534.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

22. Cuchillo, C.M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F., and Nogués, M.V. (1993).

The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: Intermediates or products? *FEBS Lett.* 333: 207–210.

23. Ledoux.L Nature (1955)

Action of ribonuclease on two solid tumors in vivo.

24. Ledoux.L Nature (1955)

Action of ribonuclease on certain ascite tumors

25. Aleksandrowicz.J.(1958)

Intracutaneous ribonuclease in chronic myelocytic leukemia.

26. Loverix, S.; Steyaert, J. (2003)

Ribonucleases: from prototypes to therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* 10, 779–785.

27. Riordan, J. F.(2001)

Angiogenin. *Methods Enzymol.*, 341, 263–273.

28. Rosenberg, H. F.; Domachowske, J. B.(2001)

Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukocyte Biol.*, 70, 691–698.

29. Rosenberg, H. F.; Domachowske, J. B.(2001)

Eosinophil-derived neurotoxin. *Methods Enzymol.*, 341, 273–286.

30. Venge, P.; Bystrom, J.; Carlson, M.; Hakansson, L.; Karawacjzyk, M.; Peterson, C.; Seveus, L.; Trulsson, A. (1999)

Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin. Exp. Allergy* , 29, 1172–1186

31. Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L., and Rosenberg, H. F. (1998)

*Nucleic Acids Res.* 26, 3358-3363.

32. Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Bonville, C. A., and Rosenberg, H. F. (1998)

*J. Infect. Dis.* 177, 1458-1464.

33. Shapiro, R., and Vallee, B. L. (1989)

*Biochemistry* 28, 7401-7408.

34. Shapiro, R., Fox, E. A., and Riordan, J. F. (1989)

*Biochemistry* 28, 1726-1732.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

35. Sorrentino, S., Glitz, D. G., Hamann, K. J., Loegering, D. A., Checkel, J. L., and Gleich, G. J. (1992)  
*J. Biol. Chem.* 267, 14859-14865.
36. Yakovlev, G. I.; Mitkevich, V. A.; Makarov, A. A. (2006)  
Ribonuclease inhibitors. *Mol. Biol.* 40, 867–874
37. Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1985).  
Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma-cells. *Biochemistry* 24: 5480–5486.
38. Olson, K. A., Fett, J. W., French, T. C., Key, M. E., and Vallee, B. L. (1995)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 442-446.
39. Olson, K. A., and Fett, J. W. (1996)  
*Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 37, 57.
40. Gullberg, U., Widegren, B., Arnason, U., Egesten, A., and Olsson, I. (1986)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 1239-1242.
41. Ackerman, S. J., Gleich, G. J., Loegering, D. A., Richardson, B. A., and Butterworth, A. E. (1985)  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 735-745.
42. Lehrer, R. I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K. J., and Gleich, G. J. (1989)  
*J. Immunol.* 142, 4428-4434.
43. Durack, D. T., Ackerman, S. J., Loegering, D. A., and Gleich, G. J. (1981)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5165-5169.
44. Fredens, K., Dahl, R., and Venge, P. (1982)  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 361-366.
45. Gleich, G. J., Loegering, D. A., Bell, M. P., Checkel, J. L., Ackerman, S. J., and McKean, D. J. (1986)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3146-3150.
46. Russo, A.; Acharya, K. R.; Shapiro, R. (2001)  
Small molecule inhibitors of RNase A and related enzymes. *Methods Enzymol.*, 341, 629 –648.
47. Leonidas, D. D.; Chavali, G. B.; Oikonomakos, N. G.; Chrysina, E. D.; Kosmopoulou, M. N.; Vlassi, M.; Frankling, C.; Acharya, K. R. (2003)  
Highresolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α (RNase A) ΑΠΟ ΒΟΟΕΙΔΗ.

and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors. *Protein Sci.* 12, 2559–2574.

48. Jenkins, C. L.; Thiyagarajan, N.; Sweeney, R. Y.; Guy, M. P.; Kelemen, B. R.; Acharya, K. R.; Raines, R. T. (2005)  
Binding of non-natural 3'-nucleotides to ribonuclease A. *FEBS J.* 272, 744–755.
49. Jenkins, J. L.; Shapiro, R. (2003)  
Identification of small-molecule inhibitors of human angiogenin and characterization of their binding interactions guided by computational docking. *Biochemistry* 2003, 43, 6674–6687.
50. Jardine Anwar M., Leonidas Demetres D., Jenkins Jeremy L., Park Chiwook, Raines Ronald T., Acharya K. Ravi, and Shapiro Robert (2001)  
Cleavage of 3', 5'-Pyrophosphate-Linked Dinucleotides by Ribonuclease A and Angiogenin
51. Samanta Anirban, Leonidas Demetres D., Dasgupta Swagata, Pathak Tanmaya, Zographos Spyros E., and Oikonomakos Nikos G. (2008)  
Morpholino, Piperidino, and Pyrrolidino Derivatives of Pyrimidine Nucleosides as Inhibitors of Ribonuclease A: Synthesis, Biochemical, and Crystallographic Evaluation
52. Balatsos NA, Vlachakis D, Maragozidis P, Manta S, Anastasakis D, Kyritsis A, Vlassi M, Komiotis D, Stathopoulos C. (2009)  
Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry* 48: 6044-51
53. Greiner-Stoeffele Thomas, Grunow Marlis, and Hahn Ulrich (1996)  
A General Ribonuclease Assay Using Methylene Blue *Anal. Biochem.* 240: 24-28.
54. Manta S., Agelis G., Botic T, Cencic A., Komiotis D. (2007)  
Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-β-D-glycopyranosyl derivatives of N<sup>4</sup>-benzoyl cytosine. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 980-987.