



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΚΟΝΤΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΥΡΙΝΟ- ΚΑΙ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ-
ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Μελέτη της επίδρασης τροποποιημένων πουρινο- και
πυριμιδινο- νουκλεοζιτών στην ενεργότητα της
ριβονουκλεάσης Α.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Δρ. Δημήτριος Λεωνίδας

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Δημήτριος Κομώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή μου και ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή κ.Μπαλατσό Λέκτορα Βιοχημείας για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος καθώς και την ευκαιρία που μου δόθηκε να συνεργαστώ με τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Η βοήθεια, η καθοδήγησή τους σε συνδυασμό με την άριστη συνεργασία υπήρξε πολύτιμη για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω πολύ τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Μαραγκοζίδη για την πολύτιμη βοήθεια του και την υπομονή του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους.

Περιεχόμενα

Abstract	6
Περίληψη.....	7
Εισαγωγή	8
Νουκλεάσες	8
Θεωρητικό Μέρος.....	9
Υπεροικογένεια Ριβονουκλεάσης A-Ονοματολογία	9
Ριβονουκλεάση A	12
Δομή ριβονουκλεάσης A	12
Ενεργό κέντρο	13
Καταλυτικός Μηχανισμός.....	14
Υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος	16
Τα βοηθητικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου	18
Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην αναδίπλωση.....	20
Αναστολείς.....	21
Σκοπός	24
Υλικά και μέθοδοι.....	25
Υλικά	25
Μέθοδοι.....	28
Μέτρηση Συγκεντρώσεων	28
Πρότυπη Καμπύλη tRNA	29
Χρονοκαμπύλη.....	29
Πειραματική διαδικασία	30
Αποτελέσματα	32
Υπολογισμός της K_i	34
Κινητική μελέτη με αναστολέα: 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο] -5-θυμίνη.....	36
Κινητική μελέτη με αναστολέα: ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη(11VP010)	38
Συμπεράσματα-Συζήτηση	40
Βιβλιογραφία	42

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-thymine and ribofuranosyl-5-thymine by kinetic experiments. Both compounds were found to be competitive inhibitors with respect of the substrate (tRNA) with K_i values of 25,82 μ M and 44,08 μ M, respectively.

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική 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 υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α. Τα πειράματα αρχικά διεξάγονται στην ριβονουκλεάση Α το βασικό ένζυμο της υπεροικογένειας 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-θυμίνη και ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη στην ενζυμική δραστηριότητα της ριβονουκλεάσης Α. Οι ενώσεις αυτές δείχθηκε πως είναι συναγωνιστικοί αναστολείς ως προς το υπόστρωμα (tRNA) με σταθερές αναστολής (K_i) 25,82μM και 44,08μM αντίστοιχα.

Εισαγωγή

Νουκλεάσες

Οι νουκλεάσες μπορούν να διασπούν 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 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 φωσφορυλίωσης. Μια δεύτερη διάκριση των νουκλεασών γίνεται με βάση τη θέση διάσπασης του RNA. Οι ενδονουκλεάσες διασπούν δεσμούς στο εσωτερικό των μορίων RNA ή DNA δημιουργώντας ξεχωριστά, μικρότερα τμήματα DNA. 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, από το άκρο του μορίου DNA ή RNA απελευθερώνοντας μονονουκλεοτίδια. Το υπόστρωμά τους είναι πάντοτε μονόκλωνες αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων. Κάθε εξωνουκλεάση έχει μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Διασπά δηλαδή τα νουκλεοτίδια είτε από το 5' άκρο είτε από το 3' άκρο και συνεχίζει προς το άλλο άκρο. (Genes VIII, Benjamin Lewin)

Οι νουκλεάσες ταξινομούνται εξελικτικά. Η ταξινόμηση γίνεται με βάση την υπεροικογένεια πρωτεϊνών και όχι τις λειτουργικές ιδιότητές τους, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η τελική ταξινόμηση συμφωνεί με τις χημικές και καταλυτικές ιδιότητες. Με βάση τους κανόνες που χρησιμοποιεί η SCOP (*Structural Classification Of Proteins*) (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop>), οι υπεροικογένειες με κοινή δομή και μοτίβο αναδίπλωσης του καταλυτικού κέντρου κατηγοριοποιούνται στην ίδια αναδίπλωση. 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. 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.

Η ριβονουκλεοτική δραστηριότητα εμφανίζεται σε όλους τους ιστούς και τις εκκρίσεις των θηλαστικών. Για το λόγο αυτό, 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 Α 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. (Beintema J.J., 1998)

Nomenclature of mammalian members of ribonuclease A superfamily.					
			Human	Ox	Mouse
Secretory (plasma/pancreas type)	pt	pancreatic-type	RNase 1 HPR	RNase A (pancreas) BS RNase, RNase S (semen) BRb RNase, RNase B (brain)	RNase 1, mPr
Nonsecretory (liver/spleen type)	npt	neurotoxin-type	RNase 2 EDN HLRNase RNase 3 ECP		mEAR-1 mEAR-2 mR-3 mR-4 mR-5 mR-6P
			RNase 6 hRK6	RNase K2 (bRK6)	
	pt/npt	liver-type	RNase 4	RNase BL4	
Angiogenin	ang		RNase 5	Ang-1 Ang-2	Ang-1 Ang-3 Ang-4 Ang-2 (AngRP) Ang-ps1 Ang-ps2

Ονοματολογία μελών της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α των θηλαστικών.

Θεωρητικό Μέρος

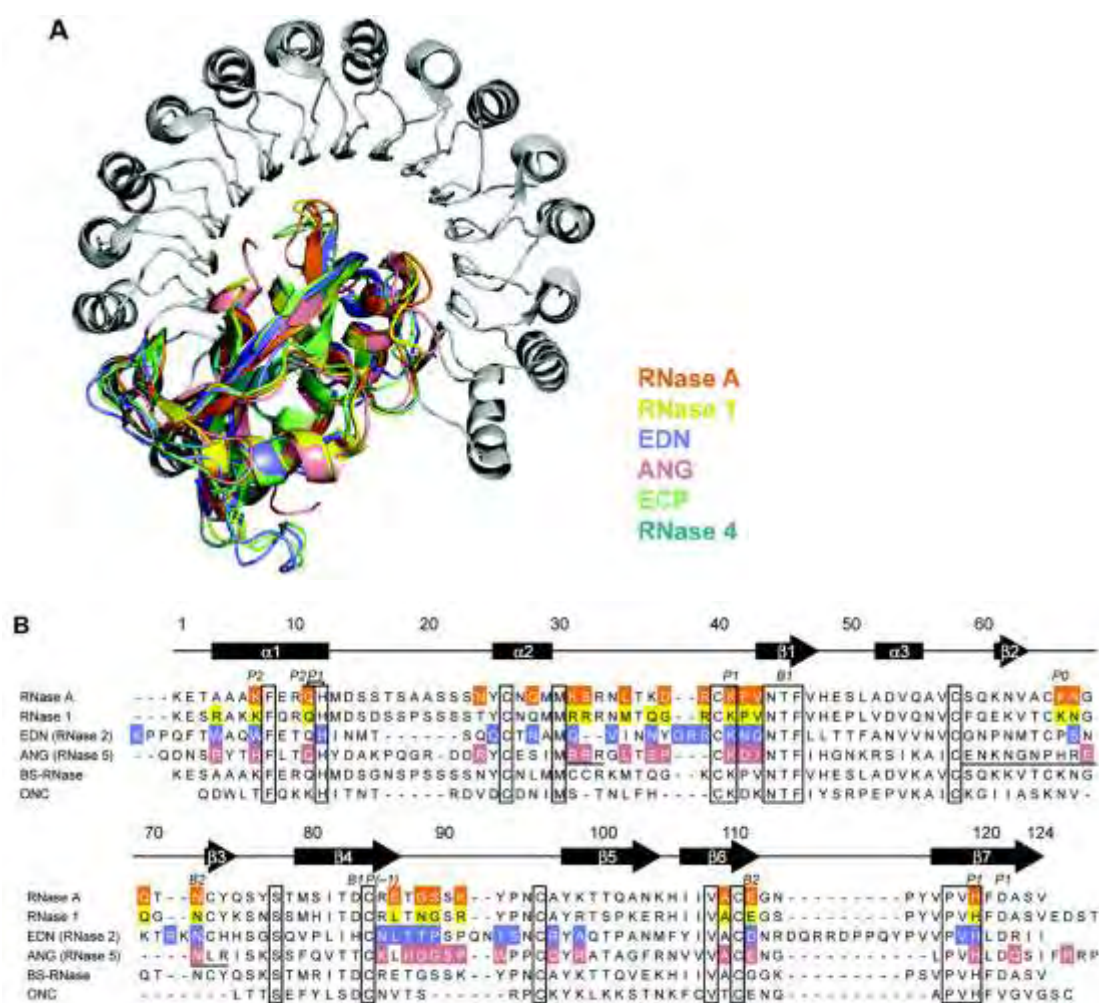
Υπεροικογένεια Ριβονουκλεάσης Α-Ονοματολογία

Η ριβονουκλεάση Α απομονώθηκε από παγκρεατικό ιστό και μελετήθηκε από το 1950 έως και το 1960 τόσο σε δομικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο. Σε αυτό συνέβαλε η θερμοσταθερότητα που την χαρακτηρίζει και η σχετικά άφθονη συγκέντρωση της στον παγκρεατικό ιστό. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α είναι μια ενδοριβονουκλεάση, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφωδιεστερικών

δεσμών στις αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφορυλίωσης και μιας υδρόλυσης. [Stewart et al,1990]. Το γράμμα «A» αναφέρεται στην επικρατέστερη μορφή του ενζύμου στο πάγκρεας του βοδιού. Η διαφορά των ριβονουκλεασών A, B, C, D που είναι ισοένζυμα, σχετίζεται με τη γλυκοζυλίωση τους. Η RNase A δεν είναι γλυκοζυλιωμένη, ενώ αντίθετα στην RNase B προσκολλάται ένας απλός ολιγοσακχαρίτης στο άζωτο της πλευρικής αλυσίδας της Asn34.(D' Alessio et al ,1991). Αποτελεί πρότυπο μοντέλο της υπεροικογένειας ριβονουκλεασών για τους χημικούς ενζυμολόγους, βιοφυσικούς φαρμακοποιούς, δομικούς βιολόγους και βιολόγους της εξέλιξης. Τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω ανακάλυψης των ομόλογων ριβονουκλεασών της υπεροικογένειας ενζύμων της RNase A οι οποίες παρουσιάζουν κυτταροτοξική δραστηριότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, το ενδιαφέρον στράφηκε για την αξιοποίηση αυτών των δραστηριοτήτων για θεραπευτικούς σκοπούς. Πολλές λεπτομέρειες για τον μηχανισμό κυτταροτοξικότητας των ριβονουκλεασών παραμένουν αδιευκρίνιστες (Rutkosk J.Thomas et al, 2008).

Περαιτέρω έρευνες είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση ενζύμων της οικογένειας των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση. Η επίδραση των ριβονουκλεασών στην ανάπτυξη των όγκων έχει μελετηθεί εκτεταμένα κυρίως με ζωικά ριβονουκλεολυτικά ένζυμα, τη βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A), τη BS-RNase, την ογκονάση (onconase) αλλά και με ανθρώπινες ριβονουκλεάσες όπως η αγγειογενίνη και η RNase 1. Ενώ η βόεια παγκρεατική RNase A ασκεί δευτερεύουσα επίδραση στον όγκο, η BS-RNase και η ογκονάση ασκούν σημαντικές πρωτογενείς δράσεις στον καρκίνο. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης έδειξαν πως, μερικές μόνο αντικαταστάσεις αμινοξέων στην ανθρώπινη παγκρεατική ριβονουκλεάση (RNase 1) με ομόλογα αμινοξέα στη BS-RNase, έχουν ως συνέπεια η πρώτη να γίνει πιο κυτταροτοξική σε κύτταρα λευχαιμίας. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές πρωτεΐνες έγκειται στη δυνατότητα σύνδεσης τους στον πρωτεϊνικό ριβονουκλεολυτικό αναστολέα (RI). Ο αναστολέας αυτός βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα στο σώμα και εμποδίζει οποιαδήποτε ριβονουκλεάση να «επιτεθεί» και να καταστρέψει το ριβοσωμικό RNA. Η κυτταροτοξική δράση της BS-RNase αποδίδεται στην ικανότητα της να διαπερνά μόνο καρκινικά κύτταρα εισερχόμενη στο κυτταροπλάσμα όπου, αποφεύγοντας τον ισχυρό πρωτεϊνικό κυτταροπλασματικό αναστολέα (RI) λόγω της διμερούς της δομής, αποικοδομεί το ριβοσωμικό RNA

σταματώντας την πρωτεϊνική σύνθεση οδηγώντας έτσι τον θάνατο του κυττάρου (Matoušek, 2001)(Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η αμινοξική αλληλουχία της ριβονουκλεάσης Α σε στοίχιση με τέσσερις ριβονουκλεάσες, των οποίων η δομή τους έχει αποκαλυφθεί σε σύμπλοκο με την RI (RNase A, RNase 1, EDN, ANG) και οι δύο ομόλογες ριβονουκλεάσες (BS-RNase και onconase)

Μέλη της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α που συμπεριλαμβάνονται είναι η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές άλλες κυτταροτοξίνες (Rosenberg Helene F. 2008). Οι ριβονουκλεάσες αυτής της

υπεροικογένειας βρίσκονται σε ένα εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 (Rosenberg Helene F. et al, 2008).

Η αγγειογενίνη εμφανίζει αμινοξική ομολογία κατά 33% με την ριβονουκλεάση A, ενισχύει την ανάπτυξη των όγκων. Αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες αγγειογένεσης (Fett et al, 1987).

Η κυτταροτοξική ιδιότητα ορισμένων ριβονουκλεασών όπως έχει προαναφερθεί μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας κατηγορίας φαρμάκων ενάντια διαφόρων καρκινικών τύπων, χωρίς τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας (Raines Ronald, 1998). Είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να προσδένεται στην αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η δημιουργία αγγειογένεσης που βοηθά στην ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα θα γίνει χορήγηση των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση, οι οποίες δεν δεσμεύονται από τον πρωτεϊνικό αναστολέα RI, που θα οδηγήσει στην καταστολή του όγκου. Πρότυπο-μοντέλο για την ανάπτυξη αναστολέων αποτελεί η ριβονουκλεάση A η οποία εμφανίζει μεγάλη αμινοξική ομολογία με τα περισσότερα μέλη της υπερικογένειας. Έτσι, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα αναστολείς της RNase A είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί, εξειδικευμένοι και αποτελεσματικοί αναστολείς κυρίως της αγγειογενίνης, οι οποίοι μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Leonidas et al, 2003).

Ριβονουκλεάση A

Δομή ριβονουκλεάσης A

Η ριβονουκλεάση A η οποία αποτελείται από 124 αμινοξέα με μοριακό βάρος 13.7 kDa, αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά β-κλώνους, οι οποίοι σχηματίζουν ένα β-πτυχωτό φύλλο. Τα στοιχεία δευτεροταγούς διαμόρφωσης μπορεί να θεωρηθούν ότι οργανώνονται σε δύο 'ομάδες'. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την 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). Οι δύο ομάδες συναντώνται

σε μια θετικά φορτισμένη αύλακα στην οποία συνδέεται το υπόστρωμα RNA. Η N-τελική α-έλικα (α1, κατάλοιπα 3-13) βρίσκεται 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 συντελεστές και εμφανίζεται ευκίνητο. 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.

Επιπλέον, η ριβονουκλεάση εμφανίζει τέσσερις X-Pro πεπτιδικούς δεσμούς, εκ των οποίων οι δύο είναι 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 (Stewart et al, 1990)(Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Δομή της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A.

Ενεργό κέντρο

Το ενεργό κέντρο της RNase A διαμορφώνεται από τα αμινοξέα His12, His119 και Lys41. Η οποιαδήποτε χημική μεταβολή σε αυτά τα αμινοξέα έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται το μεγαλύτερο ποσοστό της δραστηρότητας του ενζύμου. Επιπλέον, μελέτες με περιθλάση ακτίνων X έδειξαν ότι τα αμινοξέα His12, His119 προκαλούν

την υδρολύση ενώ τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA απέδειξαν πως αυτές δρουν ως ένα οξύ και μια βάση αντίστοιχα και η Lys41 σταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση. Ο ρόλος της His119 στην υδρολύση εκτός από την πρωτονίωση ενός ατόμου οξυγόνου του υποστρώματος βοηθά και στην σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης μέσω δεσμών υδρογόνου (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

Καταλυτικός Μηχανισμός

Όπως έχει προαναφερθεί η ριβονουκλεάση Α καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA(Εικόνα 3). Η υδρολύση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση Α γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος και ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικό-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η υδρολύση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα (Moussaoui Mohamed et al, 1998).

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρολύση, η οποία είναι μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρολύσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση (Stryer et al, 2002).

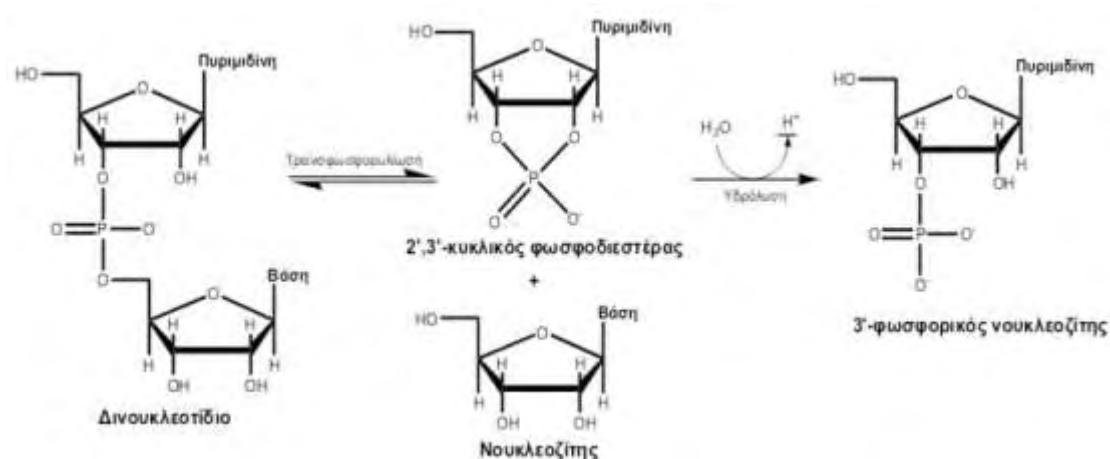
Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει.

Όπως είδαμε τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys41. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-Ο με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του Ο. 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 την 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. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντας 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. 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.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνεται 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'-O βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-O βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο O από το νερό (H₂O) βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (Stryer et al, 1997).



Εικόνα 3. Μηχανισμός κατάλυσης βόεια παγκρεατικής RNase A

Υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Ομάδες υποπεριοχών

Κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων της ριβονουκλεάσης Α με ανάλογα υποστρωμάτων και με μια σειρά πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης σε αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου οδήγησαν στον προσδιορισμό έξι βοηθητικών περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος, τις P-1, P0, P1, P2, B1, B2 και B3. Τα αμινοξέα που περιλαμβάνονται σε αυτές τις περιοχές αντίστοιχα είναι η Arg85 στην P-1, η Lys66 στην P0, η Gln11, His12, Lys41, His119, Phe120 και Asp121 στην P1, η Lys7 και η Arg10 στην P2, η Thr45, Asp83 και Phe120 στην B1, Asp71 και Glu111 στην B2. Οι Bx και Px περιοχές προσδένουν αντίστοιχα τις βάσεις και τις ομάδες των φωσφόρων (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

Υποπεριοχή B1

Η B1 υποπεριοχή περιλαμβάνει τα αμινοξέα Thr45, Asp83, Phe120 προσδένει μόνο πυριμιδίνες και προτιμά περισσότερο την κυτιδίνη παρά την ουρακίλη. Η αντικατάσταση της Thr45 με αλανίνη ή γλυκίνη διεύρυνε την εξειδίκευση της B1 υποπεριοχής επιτρέποντας της να αλληλεπιδρά με την αδερίνη και κατ'επέκταση επιτρέποντας την υδρόλυση όχι μόνο poly(U) και poly(C) αλλά και poly(A) υποστρωμάτων. Με αυτό το πείραμα αποδείχθηκε ότι η Thr45 συμβάλει στην εξειδίκευση της ριβονουκλεάσης Α. Αυτή η εξειδίκευση της Thr45 φαίνεται από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει με τις πυριμιδίνες και τους στερικούς αποκλεισμούς της αδερίνης. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η Thr45 παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση και με την αποσταθεροποίηση της αρχικής κατάστασης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

Ενώ η κρυσταλλική δομή της ριβονουκλεάσης Α δείχνει ότι η υδροξυλική ομάδα της Thr45 αλληλεπιδρά απευθείας με την βάση του προσδεδεμένου νουκλεοτιδίου, η

καρβοξυλική ομάδα της Asp83 δεν μπορεί να κάνει το ίδιο. Εντούτοις η Asp83 μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με την υδροξυλική ομάδα της Thr45 μόνο στην περίπτωση που μια ουριδίνη προσδεθεί στην B1 υποπεριοχή. Αυτός ο δεσμός υδρογόνου διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το καταλυτικό κέντρο μέσω σταθεροποίησης της μεταβατικής και όχι της αρχικής κατάστασης. Η Phe120, το άλλο αμινοξύ της B1 υποπεριοχής, φαίνεται ότι επαυξάνει την πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτό το πετυχαίνει με την βοήθεια των ηλεκτρονίων και με την υδροφοβικότητα της, δεν διαμεσολαβεί όμως και στο αν θα προσδεθεί πουρίνη ή πυριμιδίνη. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της ριβονουκλεάσης A με κυκλικό ουριδινικό βανάδιο ($U > v$) δείχνει ότι η Phe120 διαμεσολαβεί στην σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης κατά την διάρκεια της κατάλυσης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

Υποπεριοχή B2

Η υποπεριοχή B2 περιλαμβάνει αμινοξέα Asp71, Glu111 και έχει προτίμηση σε αδενίνη. Πειράματα αντικατάστασης της Asp71 της υποπεριοχής B2 από άλλα αμινοξέα έδειξαν ότι το αμινοξύ αυτό είναι υπεύθυνο για αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε αποδοτική δραστηριότητα. Από την άλλη μεριά αντικατάσταση του Glu111 με γλουταμίνη δεν επηρεάζει τον ρυθμό υδρόλυσης του CpA αλλά μειώνει τον ρυθμό υδρόλυσης του CpG. Συνεπώς, το Glu111 συμβάλλει στην πρόσδεση του υποστρώματος μόνο στην περίπτωση πρόσδεσης της γουανοσίνης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

Υποπεριοχή P2

Η υποπεριοχή P2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα Lys7, Arg10. Η χημική μεταβολή της Lys7 ή της Arg10 ή η μετάλλαξη αυτών των αμινοξέων σε γλουταμίνη έχει ως αποτέλεσμα να χάνει η ριβονουκλεάση A την ενδονουκλεολυτική της δραστηριότητα, η οποία αντικαθίσταται από μια εξωνουκλεολυτική. Επιπλέον, τα αμινοξέα αυτά συμμετέχουν στον τερματισμό της δράσης του ενζύμου (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).

2.3.4 Υποπεριοχή P1

Η υποπεριοχή P1 περιλαμβάνει το αμινοξύ Gln11. Η Gln11 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω του αζώτου της κύριας αλυσίδας της με την φωσφορική ομάδα του υποστρώματος, που είναι προσδεδεμένη στην υποπεριοχή P1. Η αντικατάσταση της Gln11 με αλανίνη, ασπαραγίνη ή ιστιδίνη έδειξε ότι η Gln11 αυξάνει την ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και επιταχύνει την αντίδραση της κατάλυσης. Τέλος, σταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση κατά τη διάρκεια της κατάλυσης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001]

Τα βοηθητικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου

Τα αμινοξέα που είναι κοντά σε αυτά του καταλυτικού κέντρου βοηθούν στην κατάλυση. Αυτό συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασης με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου με σκοπό να επιτύχουν την κατάλληλη τοποθέτηση του υποστρώματος ή την κατάλληλη pKa (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2002).

Μερικοί από τους έμμεσους ρόλους των αμινοξέων Lys7, Arg10, Lys66 στην καταλυτική δράση της ριβονουκλεάσης A έχουν διαλευκανθεί από την πραγματοποίηση μεταλλάξεων, οι οποίες δεν επηρεάζουν σημαντικά μόνο την Km αλλά και την Kcat. Έχει παρατηρηθεί ότι η κύρια αλυσίδα της Lys66 συμβάλλει στην κατάλληλη ευθυγράμμιση της His119. Επιπλέον, η αντικατάσταση των αμινοξέων αυτών επηρεάζει όχι μόνο την πρόσδεση μακριάς αλυσίδας RNA, το οποίο χρειάζεται όλες τις υποπεριοχές πρόσδεσης αλλά επίσης και την πρόσδεση του C>p, το οποίο αλληλεπιδρά με τις υποπεριοχές B1 και P1. Αυτό αποδεικνύει ότι τα αμινοξέα της υποπεριοχής P2 παίζουν κάποιον έμμεσο ρόλο στην δραστικότητα. Πρόσφατα, δείχθηκε πως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων Lys7, Arg10, Lys66 βοηθούν στη διατήρηση της βέλτιστης τιμής του pKa των αμινοξέων His12 και His119 (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2002).

Η αντικατάσταση του αμινοξέος Asp121 με ασπαραγίνη σε ημισυνθετική ριβονουκλεάση A μειώνει την δραστικότητα. Αποτέλεσμα αυτής της μείωσης είναι η αλλαγή της pKa της His119 και η μετακίνηση του βρόγχου των αμινοξέων 65-72 από το καταλυτικό κέντρο. Από την άλλη μεριά πρόσφατες έρευνες με τεχνικές ανασυνδιασμένου DNA έδειξαν ότι αντικατάσταση του αμινοξέος Asp121 με

ασπαραγίνη ή αλανίνη αυξάνει την δραστικότητα χωρίς να αλλάζει την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου.

Η Phe120 όπως έχει προαναφερθεί βρίσκεται στην υποπεριοχή B1. Η αντικατάσταση αυτού του αμινοξέος με κάποιο άλλο επηρεάζει όχι μόνο την K_m αλλά και την K_{cat} . Οι ρυθμοί καρβοξυμεθυλίωσης της His12 και His119 και οι κρυσταλλικές δομές μεταλλαγμένων μορφών της ριβονουκλεάση A όπου η Phe120 είχε αντικατασταθεί από αλανίνη, γλυκίνη ή τρυπτοφάνη έδειξαν αλλαγές στη θέση της πλευρικής αλυσίδας της His119, οι οποίες συνάδουν με την παρατηρούμενη μείωση της δραστικότητας. Η Phe120 φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την πολύ συγκεκριμένη τοποθέτηση της His119. Η δραστικότητα μειώνεται όταν αυξάνεται η απόσταση ανάμεσα στην Nδ1 της His119 και Ne2 της His12, όπως φάνηκε από κρυσταλλικές δομές μεταλλαγμένης ριβονουκλεάσης A. Όπως η Asp121 έτσι και η Phe120 συμμετέχει στην σταθερότητα της δομής. Η αντικατάσταση της Phe120 επηρεάζει επίσης και την θερμική σταθερότητα του ενζύμου.

Το αμινοξύ Tyr97 εμπλέκεται μέσω δεσμών υδρογόνου με το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της Lys41. Η αντικατάσταση της Tyr97 με φαινυλαλανίνη, αλανίνη ή γλυκίνη οδηγεί στην μείωση της καταλυτικής δράσης, κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η Tyr97 εμπλέκεται στην διατήρηση της σωστής τοποθέτησης της Lys41 (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2002].

Η αντικατάσταση των κυστεϊνών Cys40- Cys95 και Cys65-Cys72 με αλανίνη μειώνει την θερμική σταθερότητα κατά 40°C χωρίς να επηρεάζει τον λόγο K_{cat}/K_m για υποστρώματα πολύ(C), η απλή αφαίρεση όμως των Cys40- Cys95 και Cys65-Cys72 μειώνει δραματικά τον λόγο K_{cat}/K_m προκειμένου να επιτευχθεί σταθερότητα της δομής. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αυτών των κυστεϊνών βρίσκονται κοντά τόσο στα καταλυτικά αμινοξέα όσο και σε αυτά που προσδένουν το υπόστρωμα και φαίνεται ότι δευκολύνουν την κατάλληλη ευθυγράμμιση αυτών των αμινοξέων (π.χ Lys41 και Lys66). Η αφαίρεση των Cys40-Cys95 αφαιρεί και τον δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στην Lys41 και την Tyr97, ο οποίος είναι απαραίτητος στην δραστικότητα του ενζύμου. Το αποτέλεσμα είναι ότι αυξάνεται η κινητικότητα του βρόγχου 65-72 και σταματά η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην Lys66 και στην His119 (Eri Chatani & Hayashi Rikimaru, 2001).

Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην αναδίπλωση

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες πάνω στους δισουλφιδικούς δεσμούς των κυστεϊνών του ενζύμου άλλα και σε άλλα πεπτιδία προκειμένου να διαπιστωθεί ο ακριβής ρόλος τους στην διαμόρφωση της δομής της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α. Αυτές οι μελέτες περιελάμβαναν την εξάλειψη δισουλφιδικών δεσμών ή την χημική παρεμπόδιση των ελεύθερων Cys να συμμετάσχουν στην αναδίπλωση ή ακόμα και την αφαίρεση αμινοξέων.

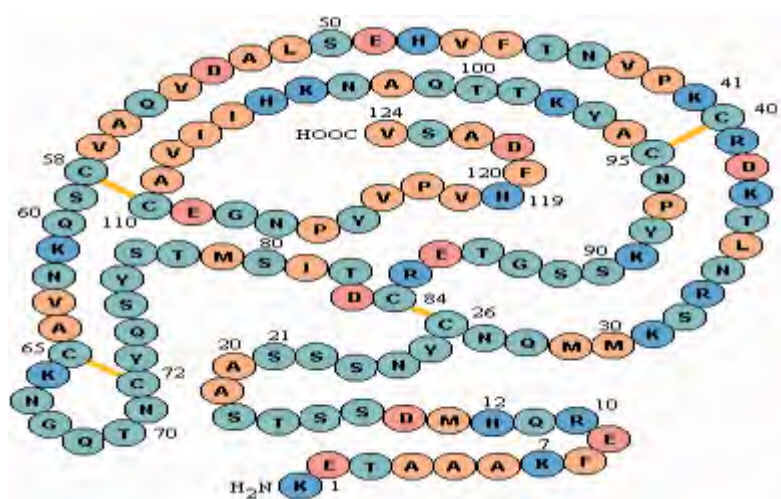
Αμινοξέα της Ν-τελικής περιοχής : Τα αμινοξέα Glu2, Arg10 και His12 έχει φανεί μέσω πειραμάτων μεταλλάξεων ότι συμβάλλουν στην σταθεροποίηση της έλικας που σχηματίζεται από τα αμινοξέα 3-13, επιπλέον σημαντικό ρόλο παίζει και η Phe8 στην σταθερότητα της α-έλικας.

Η ριβονουκλεάση Α περιέχει 4 αμινοξέα προλίνης, Pro42, Pro93, Pro114, και την Pro117. Στο στάδιο της αναδίπλωσης δύο ζεύγη, η Tyr92-Pro93 και Asn113-Pro114 σχηματίζουν cis διαμόρφωση και τα δύο ζεύγη, Lys41-Pro42 και Val116-Pro117 σχηματίζουν trans διαμόρφωση. Πειράματα έχουν δείξει ότι οι πεπτιδικοί δεσμοί των Tyr92-Pro93, Asn113-Pro114 και Val116-Pro117 επηρεάζουν την διαδικασία της αναδίπλωσης (Εικόνα 4).

С-τελική περιοχή : Η σημαντική συμβολή του καρβοξυτελικού άκρου στην αναδίπλωση του καταλυτικού κέντρου φάνηκε με την πραγματοποίηση μετάλλαξης στα αμινοξέα 121-124. Επιπλέον, με άλλο πείραμα αφαίρεσης των αμινοξέων αυτών με σταδιακή πρωτεόλυση επηρεάστηκαν οι δισουλφιδικοί δεσμοί με αποτέλεσμα να μην γίνει η σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Τέλος, έχειδειχθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο παίζει ρόλο και στην θερμική σταθερότητα και κατ'επέκταση στην σταθερότητα της δομής της πρωτεΐνης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001). Οι κυστεΐνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της δευτεροταγούς δομής της ριβονουκλεάσης. Καθώς αρχίζουν να σχηματίζονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί αρχίζει να αυξάνεται και ο ρυθμός αναδίπλωσης. Οι Cys65-Cys72 σχηματίζουν τον δεσμό μεταξύ τους κυρίως στο πρώτο στάδιο του μονοπατιού της αναδίπλωσης επιταχύνοντας τα επακόλουθα στάδια αναδίπλωσης. Επιπλέον, αυτός ο δισουλφιδικός δεσμός συμβάλει σημαντικά στην σταθεροποίηση του υδροφοβικού πυρήνα της φυσικής πρωτεΐνης.

Η αντικατάσταση με μετάλλαξη της Phe46 με γλουταμινικό οξύ ή με λυσίνη αλλάζει ένα μέρος της β-πτυχωτής επιφάνειας σε έλικα. Επιπλέον, η αντικατάσταση της Phe46 με Val οδηγεί στην αναδίπλωση και με πλήρη δραστηριότητα, όμως η

αντικατάσταση με λυσίνη δεν οδηγεί σε αναδίπλωση. Αυτά τα αποτελέσματα και η σύγκριση με αλλαγές σε θερμοκρασία και πίεση δείχνουν ότι υδροφοβικότητα της κύριας αλυσίδας της Phe46 είναι καθοριστική στον σωστό σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής και στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης (Chatani Eri & Hayashi Rikimaru, 2001).



Εικόνα 4. Η αμινοξική αλληλουχία της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α.

Αναστολείς

Συνθετικά νουκλεοσίδια ως αναστολείς

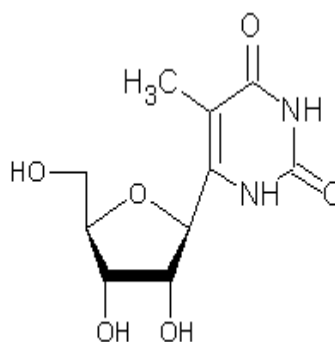
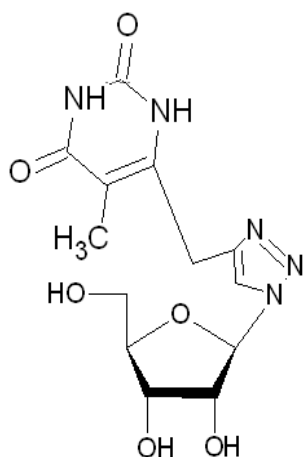
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ριβονουκλεάσης Α με νουκλεοτιδικούς ή ολιγονουκλεοτιδικούς αναστολείς έχουν μελετηθεί διεξοδικά τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες με τη βοήθεια κινητικών και φυσικών μεθόδων, με κρυσταλλογραφία ή με προσδιορισμό της δομής με NMR με αποτέλεσμα να έχουν προσδιοριστεί τουλάχιστον 20 σύμπλοκα. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια γίνονται περισσότερες προσπάθειες για την ανάπτυξη μικομοριακών αναστολέων της ριβονουκλεάσης Α. Το ενδιαφέρον για αυτό τον τομέα οδήγησε σε έρευνες για αρκετές ομόλογες ριβονουκλεάσες της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α, που περιλαμβάνουν την αγγειογενίνη (Ang), νευροτοξίνη που παράγουν τα ηωσινόφιλα (EDN) και βόεια σπερματική RNase αξιοποιώντας την ενζυματική τους δραστηριότητα έχει ως συνέπεια να οδηγούν σε φυσιολογικά αποτελέσματα. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι γνωστές ή υπάρχει η υποψία ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη ανθρώπινων ασθενειών οπότε οι αναστολείς τους μπορεί να

αποτελέσουν ως υποψήφιες φαρμακευτικές ουσίες. Ειδικοί αναστολείς-ανταγωνιστές μπορεί επίσης να φέρουν στο φως βιολογικούς μηχανισμούς αυτών των μορίων (Russo Aniello et al, 2001).

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια, είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης όπως αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη και ουρακίλη με έναν σακχαρίτη την ριβόζη και ονομάζονται ριβονουκλεοζίτες τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Ενώ όταν η νουκλεοβάση είναι συνδεδεμένη με δεοξυριβόζη ονομάζονται δεοξυριβονουκλεοζίτες. Η νουκλεοβάση συνδέεται στη 5' θέση της ριβόζης.

Τα συνθετικά ριβονουκλεοσίδια είναι σχεδιασμένα ώστε να μπορούν να συνδέονται στο ενεργό κέντρο της ριβονουκλεάσης Α και να αναστέλλουν την βιολογική λειτουργία της. Έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες διότι μπορούν να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσω ειδικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων (Damaraju Vijaya L et al, 2003), να εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα και να συνδεόμαστε στο ενεργό κέντρο των ριβονουκλεασών που οδηγούν στην καρκινογένεση όπως η αγγειογενίνη. Η πλειοψηφία των νουκλεοσιδίων ως αναστολείς έχουν όξινες ομάδες όπως η φωσφορική ή θειική. Η σύνδεση των αναστολέων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα που βρίσκονται γίνεται μέσω της πολικής φωσφορικής ή θειικής ομάδας τους. Φαίνεται ότι τον κυριότερο ρόλο διαδραματίζει η ομάδα που βρίσκεται στο 5' άκρο της ριβόζης. Αύτη η ομάδα καθορίζει τον περαιτέρω σχεδιασμό και έτσι μπορούν να βρεθούν τρόποι για την επιλογή και την αποτελεσματικότητα της σύνδεσής του στο ένζυμο (Samanta Anirban et al, 2009). Πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί αποτελεσματικοί αναστολείς όπως οι ενώσεις των αμινονουκλεοσιδίων που αποτελούνται από μια αζωτούχα νουκλεοτιδική βάση συνδεδεμένη με ένα αμινοξύ χωρίς να διαθέτουν μια από τις παραπάνω όξινες ομάδες έχοντας φορτισμένο μόνο τον κορμό τους. Οι ενώσεις αυτές συνδέονται ισχυρά με το ενεργό κέντρο τόσο της RNase Α όσο και της αγγειογενίνης (Dednath Joy et al, 2012). Σημαντικό παράδειγμα αναφοράς για τον σχεδιασμό είναι η ανακάλυψη ισχυρών αναστολέων της σιαλιδάσης, ενζύμου του ιού του κοινού κρυολογήματος. Η πρωτεάση HIV-1, η οποία αποτελεί ενζυμικό στόχο για την αντιμετώπιση του AIDS. Συνεπώς με την εύρεση κατάλληλων αναστολέων που προσδένονται ισχυρά με την πρωτεΐνη στόχο μπορούν να αντιμετωπίσουν παθολογικές καταστάσεις όπως μολύνσεις από ιούς, βακτήρια (Joy Dednath et al, 2012) και διάφοροι καρκινικοί

τύποι, όπως του μαστού, του παγκρέατος, του εντέρου, του τραχήλου της μήτρας, του προστάτη, λεμφώματα (Gao Xiangwei and Xu Zhengping, 2008). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς τα συνθετικά νουκλεοσίδια με βάση τη θυμίνη (T).



1. **1-[(1,2,3-τριάζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη 11VP002**
2. **Ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη 11VP010**

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής άσκησης αποτελεί η μελέτη της σύνδεσης των ανάλογων νουκλεοζιτών 11VP002 και 11VP010(με βάση θυμίνη) στη βόεια παγκρεατική RNάση A. Η μελέτη περιλαμβάνει κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα. Τα κινητικά πειράματα διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής της 11VP002 και 11VP010 έναντι της RNάσης A στην κατεύθυνση υδρόλυσης του tRNA, ενός ανάλογου υποστρώματος.

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες περιελάμβαναν τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X με τη χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας από κρυστάλλους του συμπλόκου RNάση A-ανάλογων νουκλεοζιτών (11VP002 και 11VP010), τον προσδιορισμό της δομής και την ανάλυση του συμπλόκου. Η δομική ανάλυση παρείχε πληροφορίες για την μοριακή αναγνώριση των ανάλογων νουκλεοζιτών από την RNάση A και επέτρεψε τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του αναστολέα και του ενζύμου.

Απώτερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η κατανόηση της μοριακής αναγνώρισης μικρών μορίων από τις ριβονουκλεάσες, οι οποίες αποτελούν ενζυμικούς «στόχους» βιοϊατρικού ενδιαφέροντος και η αξιοποίηση αυτής της γνώσης στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει φαρμάκων διαφόρων ασθενειών που προκαλούν οι ομόλογες ριβονουκλεάσες με την RNase A. Η εξειδίκευση μίας φαρμακευτικής ένωσης έναντι του πρωτεϊνικού της στόχου, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο της σε κλινικές δοκιμές.

Ο σχεδιασμός εξειδικευμένων αναστολέων αποτελεί σήμερα έναν από τους πλέον δύσκολους, αλλά και πρωταρχικούς στόχους στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, αφού απαιτεί τη γνώση της δομής και λειτουργίας, αλλά και των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση του αναστολέα. Η τρισδιάστατη δομή παρέχει άμεσες πληροφορίες για το πώς τα υποστρώματα ή οι ενζυμικοί αναστολείς συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο σύνδεσης των μακρομορίων. Συνεπώς, η γνώση της τρισδιάστατης δομής, οδηγεί στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μακρομοριακού στόχου και μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό νέων, πλέον ενεργών, φαρμάκων. Η μοριακή αυτή προσέγγιση προσφέρει μια νέα λύση και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Υλικά και μέθοδοι

Υλικά

Χημικά

Οξικό οξύ (100%) [CH_3COOH]	Merck
Οξικό Νάτριο [$\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2$]	Merck
NaH_2PO_4	Merck
Na_2HPO_4	Merck
Lanthanum Nitrate [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	Sigma
Μεθανόλη [CH_3OH]	Applichem
Περχλωρικό οξύ [HClO_4]	Fluka

Ένζυμο

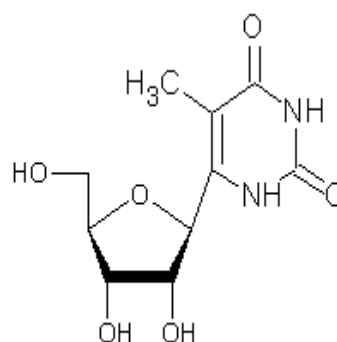
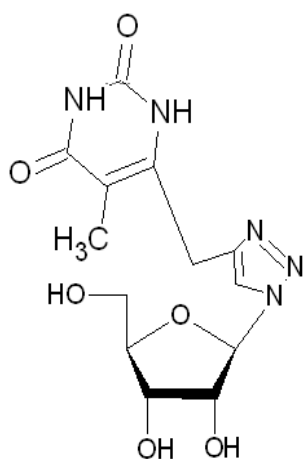
Βόεια παγκρεατική Ριβονουκλεάση Α τύπος XIIA

(Bovine Pancreatic Ribonuclease A, RNase A) Sigma

Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια

tRNA ribonucleic acid, transfer, baker's yeast Sigma

11VP002 νουκλεοσίδιο με βάση τη θυμίνη και 11VP010 με βάση τη θυμίνη.



Οι ονομασίες για 11VP002 και 11VP010 είναι αντίστοιχα:

1-[1,2,3-τριάζολο-4-ύλο]-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη (Mr: 327,3) και

Ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη (Mr: 258,23)

Γνωρίζοντας ότι η K_m του ενζύμου είναι 1μM φτιάξαμε κατάλληλες συγκεντρώσεις της ένωσης ώστε να χρησιμοποιήσουμε συγκεντρώσεις από 1μM – 50μM. Διαλύσαμε σε μεθανόλη τις ενώσεις σε αρχική συγκέντρωση 10mM με βάση το μοριακό τους βάρος (M_r) και στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αραιώση 3mM.

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια 11VP002 και 11VP010 συντέθηκαν και παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Βιοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Διευθυντής: Αν. Καθ. Δημήτριος Κομιώτης).

Διαλύματα της πειραματικής διαδικασίας

AcONa/AcOH διάλυμα χρήσης

Οξικό Νάτριο $C_2H_3Na_2 \cdot 3H_2O$ (0.2M, pH 6.0): χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH (σε τιμή 6.0) αλλά και η ιοντική ισχύς. Εταιρία Mallinckrodt Chemical Works.

Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer)

Από 50mM Sodium phosphate φτιάξαμε 0,2M NaH_2PO_4 και 0,2M Na_2HPO_4 , pH=7,4 με τελικό όγκο 100ml.

Σε διάλυμα αντίδρασης διαλύουμε και το υπόστρωμα tRNA.

Διάλυμα λήξης της αντίδρασης (Stop solution)

Για την παρασκευή, χρησιμοποιείται 40mM Lanthanum Nitrate και Perchloric acid 60% [αραίωση σε 6%], με τελικό όγκο 100ml. Η αντίδραση σταματά σε διάφορους χρόνους με την ανάμιξη 300μl του διαλύματος αντίδρασης με 300μl διαλύματος λήξης της αντίδρασης (stop solution).

Φασματοφωτομέτρηση

Κυψελίδα χαλαζία 1cm (Hellma QS, Germany)

Φασματοφωτόμετρο Genesys 10UV

Μέθοδοι

Μέτρηση Συγκεντρώσεων

Οι συγκεντρώσεις της βοείας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α 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).

Κινητικές μελέτες-Περιγραφή της μεθόδου.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην απορρόφηση του RNA στα 260nm. Το μη υδρολυμένο tRNA κατακρημνίζεται παρουσία Perchloric Acid και Lanthanum Nitrate. Με αυτό τον τρόπο παραμένει 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 την ριβονουκλεάση Α 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. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης ενώ το κυκλικό ενδιάμεσο εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιάμεσου (Leonidas et al, 2006). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα το tRNA, μπορούμε να μετρήσουμε την ταχύτητα της υδρόλυσης από τη συγκέντρωση του προϊόντος. Το υπόστρωμα απορροφά στο ίδιο μήκος κύματος 260nm με την ριβόζη της ουσίας-αναστολέα.

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 συνεχεία 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.

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)

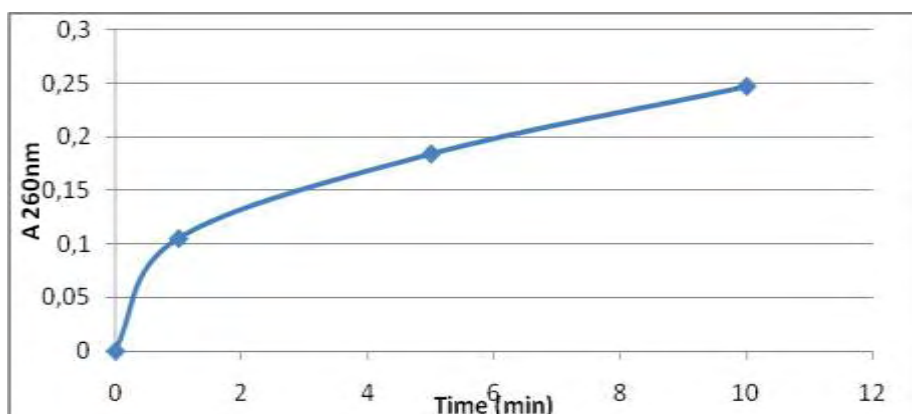
5. Προσθήκη διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (Διάλυμα τερματισμού) προκειμένου η αντίδραση να σταματήσει.

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.

Για την χημική ουσία 11VP010 – αναστολέα, ακολουθήθηκαν παρόμοιες συνθήκες με τη διαφορά ότι πριν την φασμαφωτομέτρηση το υπερκείμενο διάλυμα αραιωνόταν σε ίσο όγκο με αυτό, με απιονισμένο νερό.



Χρονοκαμπύλη για τον υπολογισμό του βέλτιστου χρόνου της κατάλυσης του υποστρώματος tRNA από την RNase A.

Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m .

Αρχικά, διεξάγονται κινητικές αντιδράσεις, δύο για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν. Για κάθε αντίδραση συλλέγεται ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης Εικόνα. Για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Graffit (Leatherbarrow Robin J., 1989) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό ο τύπος προσδιορισμού δίνεται από τον τύπο. Όπου, Slope: η κλίση της ευθείας, ϵ : συντελεστής απορρόφησης, [RNase]: η συγκέντρωση του ενζύμου

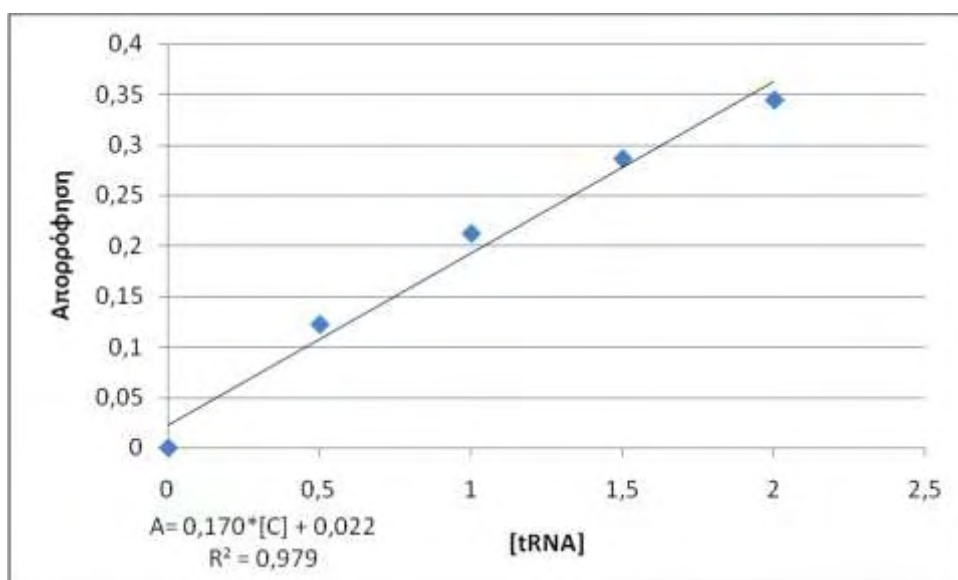
Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της K_m και της V_{max} . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear regression) η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις (σ^2) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών της K_m και της V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα για την καθεμία. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της K_m και της V_{max} της ριβονουκλεάσης A (Leonidas et al, 2006).

Αποτελέσματα

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Μετά την προσθήκη του διαλύματος αντίδρασης τα δείγματα επώαστηκαν για 10min στους 30°C και η φωτομέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 260nm. Για να μηδενιστεί το φωτόμετρο χρησιμοποιείται το διάλυμα αντίδρασης μόνο.

Πίνακας 1: Προετοιμασία δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

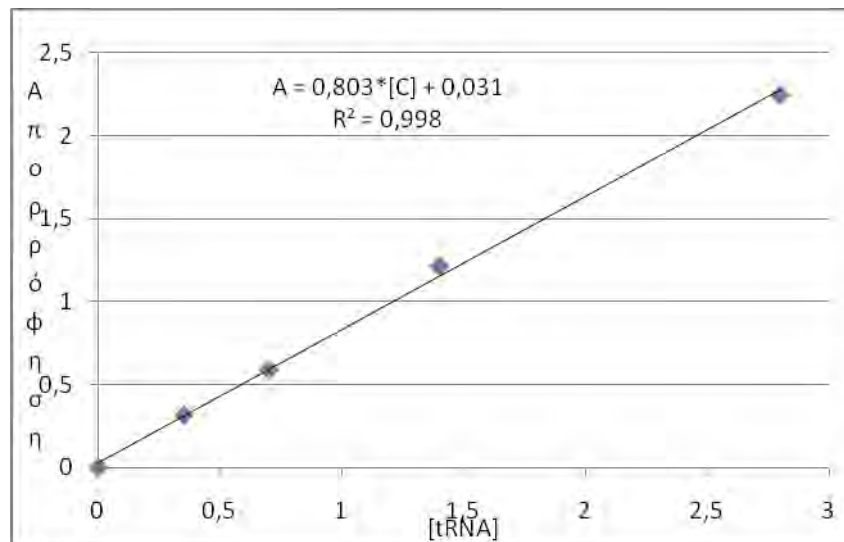
Τελική Συγκέντρωση tRNA (μM)	0	0,5	1	1,5	2
Διάλυμα Αντίδρασης (μl)	600,00	570,00	540,00	510,00	480,00
tRNA (10μM) (μl)	0	30,00	60,00	90,00	120,00
ABS ₂₆₀	0	0.122	0.212	0.286	0.344



Πίνακας 1. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm του tRNA (για συγκεντρώσεις 0,5μM, 1μM, 1,5μM, 2μM) η εξίσωση που προκύπτει $y=0,170x+0,022$ όπου A =απορρόφηση και $[C]$ =συγκέντρωση υδρολυμένου υποστρώματος (tRNA), είναι για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του tRNA που προκύπτουν με τη φασματοφωτομέτρηση (260nm) για την 11VP002.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης του tRNA στα 260nm (Πίνακας 1 και Πίνακας 2) και των απορροφήσεων των δειγμάτων στα 260nm, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδρόλυμένου tRNA σε κάθε δείγμα. Με τη βοήθεια αυτών των συγκεντρώσεων έγινε ο προσδιορισμός της ταχύτητας της αντίδρασης ανα λεπτό. Τα σχεδιαγράμματα που προέκυψαν Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk (διπλού ανάστροφου), με τη βοήθεια του προγράμματος GraFit αντιπροσωπεύουν το είδος της ενζυμικής αναστολής που προκαλεί η ουσία. Επίσης από τα παραπάνω σχεδιαγράμματα μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα για την K_m , σταθερά συγγένειας υποστρώματος με το ένζυμο και την K_i σταθερά συγγένειας του ενζύμου με τον αναστολέα, αντίστοιχα. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι ενζυμικής αναστολής: η συναγωνιστική, η μη συναγωνιστική, η ανταγωνιστική και η μικτή. Εάν ο αναστολέας δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος tRNA τότε ο αναστολέας και το υπόστρωμα συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. Ταυτόχρονα με το πρόγραμμα Grafit προσδιορίστηκε η V_{max} και η K_m του ενζύμου καθώς και τις 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.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη όπως θα δούμε παρακάτω ο αναστολέας παρουσιάζει συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition) του ενζύμου RNase A. Η V_{max} της συναγωνιστικής αντίδρασης στο διάγραμμα Lineweaver-Burk είναι σταθερή (όλες οι ευθείες διέρχονται από το ίδιο σημείο πάνω στον άξονα των y) και ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος αλλάζει μόνο η K_m .



Πίνακας 2. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 260nm του tRNA(για συγκεντρώσεις 1uM, 2uM, 3uM) η εξίσωση που προκύπτει $y=0,803x+0,031$,όπου y =απορρόφηση και x =συγκέντρωση του υδρολυμένου υποστρώματος (tRNA), είναι για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του tRNA που προκύπτουν με τη φασματοφωτομέτρηση (260nm) για την 11VP010.

Υπολογισμός της K_i

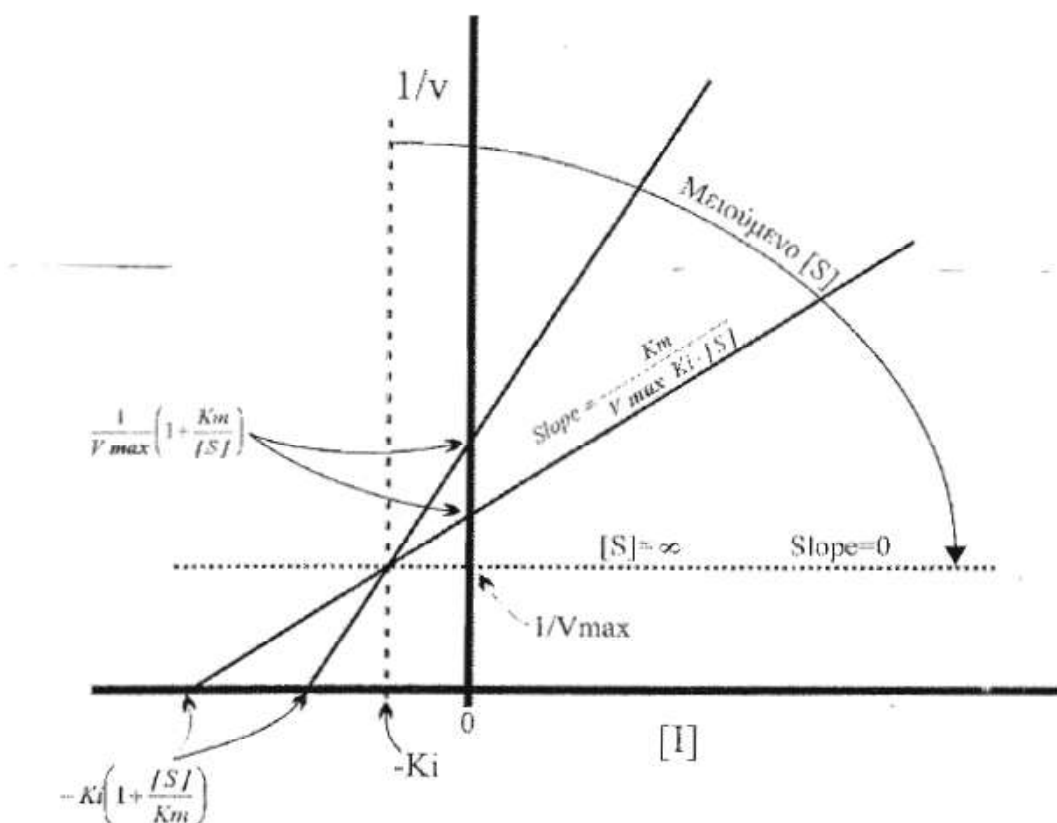
Σύμφωνα με τη μέθοδο Dixon (Segel, 1975) γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων για τον υπολογισμό της K_i . Σύμφωνα με αυτήν ισχύει :

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

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 $1/V_{\max}$. (Σχήμα 1)



Σχήμα 1: 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 $1/V_{\max}$.

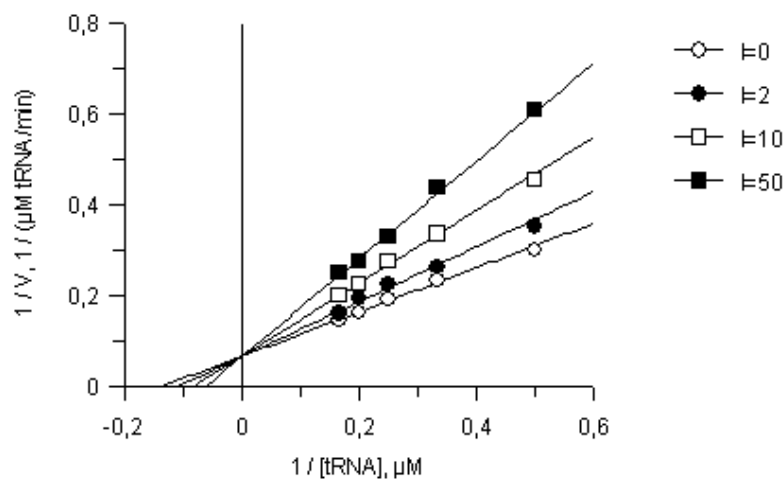
Το πρόγραμμα χρησιμοποιώντας τις ταχύτητες των αντιδράσεων από όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα σχεδιάζει τα γραφήματα. Η απόλυτη τιμή του σημείου τομής των ευθειών αντιστοιχεί στην τιμή της K_i . Εναλλακτικά, η K_i μπορεί να προσδιοριστεί αλγεβρικά. Στο σημείο τομής των ευθειών ισχύει $1/V_1 = 1/V_2$. 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-θυμίνη.

Προκειμένου να μελετήσουμε την αποτελεσματικότητα της αναστολής, την ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της RNase A αλλά και το είδος της αναστολής από την χημική ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (0μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM) και τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις χημικής ένωσης-αναστολέα (0μM, 2μM, 10μM, 50μM) με χρόνο αντίδρασης 1min (σύμφωνα με την χρονοκαμπύλη). Με τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 260nm όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του υδρολυμένου tRNA.

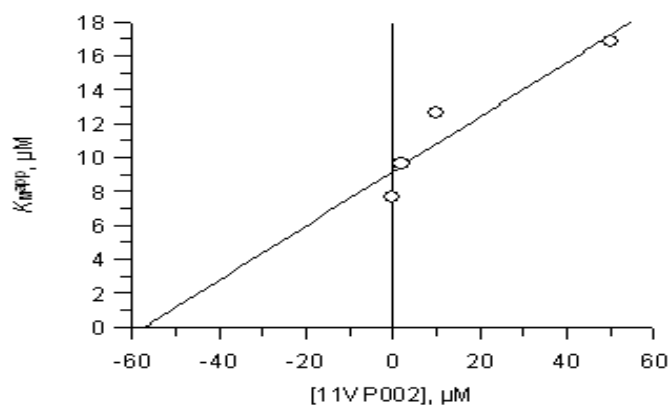
Για έλεγχο (control) στις περαιτέρω αντιδράσεις με συγκέντρωση αναστολέα (2μM, 10μM, 50μM) πραγματοποιούνται έξι αντιδράσεις απουσία αναστολέα για 1min στους 30°C, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM), παρουσία διαλύματος αντίδρασης και φυσικά του ενζύμου RNase A. Για να σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιούμε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης.

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).



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

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 25,82μM για την ουσία 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη.



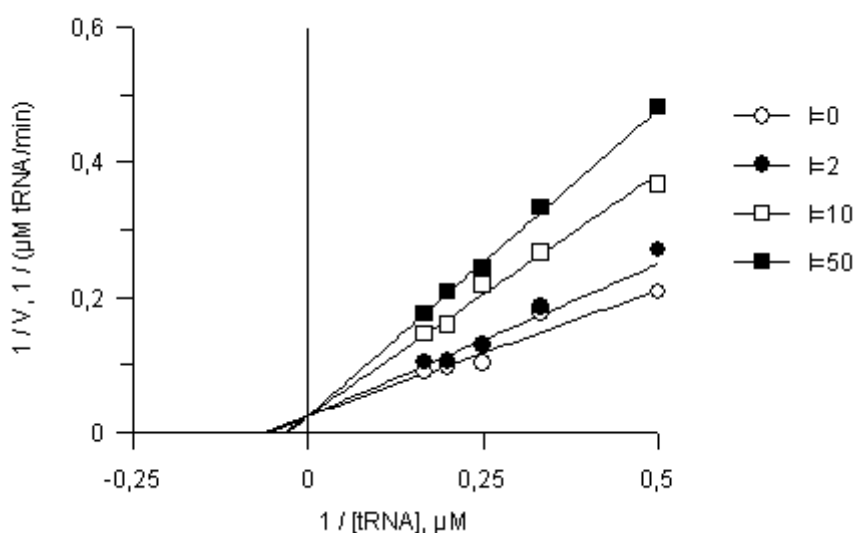
$$K_i = 25,82 \pm 0.57 \mu M$$

Διάγραμμα για τον προσδιορισμό K_i της 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη (11VP002)

Κινητική μελέτη με αναστολέα: ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη(11VP010)

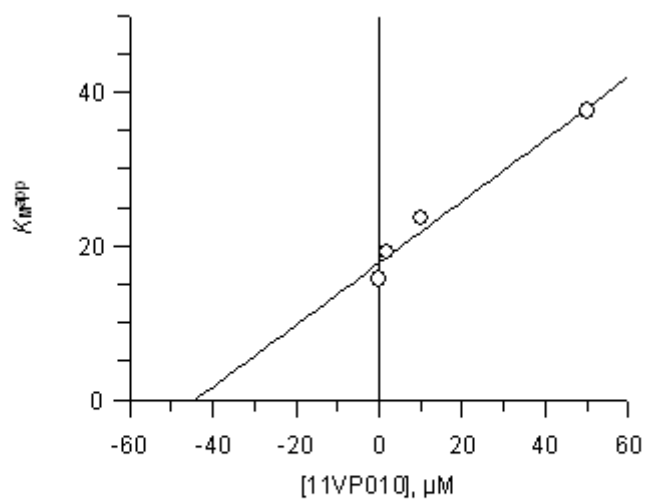
Όπως και με την πρώτη χημική ένωση έτσι και εδώ πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες αντιδράσεις έτσι ώστε να επιτευχθεί η κινητική μελέτη με αναστολέα την χημική ένωση ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη.

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



Διάγραμμα Lineweaver-Burk για συγκεντρώσεις 0μM, 2μM, 10μM και 50μM της ουσίας ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη.

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 44,08μM για την χημική ένωση ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη.



$$K_i = 44,08 \pm 1.28 \mu\text{M}$$

Διάγραμμα προσδιορισμού K_i για την ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη (11VP010)

Πίνακας 3 Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών K_i για τις ουσίες που μελετήθηκαν

Αναστολείς για RNase A	$K_i(\mu\text{M})$
11VP002	$25,82 \pm 0.57$
11VP010	$44,08 \pm 1.28$

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι ουσίες-αναστολείς προκαλούν συναγωνιστική αναστολή του καταλυτικού κέντρου της RNase A. Με βάση την τιμή της αναστολής K_i πιο αποτελεσματικός αναστολέας φαίνεται να είναι η χημική ένωση 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-θυμίνη $K_i=25,82\pm0.57$ σε σύγκριση με τον δεύτερο αναστολέα ριβοφουρανόζυλο-5-θυμίνη $K_i=44,08\pm1.28$. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της ύπαρξης του δακτυλίου αζώτου (N) στον πρώτο αναστολέα ο οποίος προσδένεται πιο ισχυρά στα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RNase A.

Γενικά, η ριβονουκλεάση A έχει χαρακτηριστεί ως το πιο μελετημένο ένζυμο του 20ου αιώνα. Έχουν γίνει πάρα πολλές έρευνες γύρω από τις ιδιότητες, την αναδίπλωση και τη λειτουργία της, ενώ σε πολλές άλλες έρευνες έχει χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο. Έτσι, σήμερα έχει συγκεντρωθεί μεγάλος όγκος πληροφοριών για το ένζυμο αυτό. Η ριβονουκλεάση A είναι το βασικό ένζυμο της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών. Το μοτίβο του καταλυτικού της κέντρου διατηρείται στην πλειονότητα των ριβονουκλεασών, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βάση για τη μελέτη όλων των ομολόγων πρωτεϊνών. Οι ριβονουκλεάσες, όπως ήδη αναφέρθηκε, σχετίζονται με τον καρκίνο. Άλλες βοηθούν την καρκινογένεση (π.χ. αγγειογενίνη), ενώ άλλες έχουν έντονη αντικαρκινική δράση (π.χ. BS-RNase). Συνεπώς, ήταν αναμενόμενο να αποτελέσουν πρωτεΐνες στόχους για τον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός ριβονουκλεολυτικών αναστολέων μικρού μοριακού βάρους έχει επικεντρωθεί σήμερα στην RNase A για τους ακόλουθους λόγους: Τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του ενζύμου έχουν μελετηθεί εκτενώς παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την RNase A αναδεικνύοντας την ως προφανή στόχο. Έχει ήδη μελετηθεί κρυσταλλογραφικά ικανός αριθμός συμπλόκων της RNase A με αναστολείς. Αντίθετα, ο σχηματισμός κρυστάλλων συμπλόκων της αγγειογενίνης με αναστολείς δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία, ενώ οι δομικές μελέτες συμπλόκων των ECP, RNase-4 και EDN είναι περιορισμένες (Boix et al, 1999; Terzyan et al, 1999; Mohan et al, 2002). Τα καταλυτικά κέντρα

τόσο της αγγειογενίνης όσο και των ECP, EDN και RNase-4 έχουν αρκετά μεγάλες δομικές ομοιότητες σε πρωτοταγές, δευτεροταγές και τριτοταγές επίπεδο με αυτό της RNase A (Boix et al. 1999) υποδηλώνοντας πως αναστολείς ειδικά σχεδιασμένοι για το καταλυτικό κέντρο της RNase A θα είναι το ίδιο δραστικοί έναντι και των υπολοίπων πρωτεϊνών, με μικρή τροποποίηση μπορούν να γίνουν ειδικοί για κάθε πρωτεΐνη. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκε και μελετήθηκε μια πληθώρα αναστολέων της RNase A. Οι ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί, άλλες με μεγαλύτερη και άλλες με λιγότερη επιτυχία είναι κυρίως μόνο- δι- και τρι-φωσφορικά νουκλεοτίδια και δινουκλεοτίδια. Όλοι οι αναστολείς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα καταλαμβάνουν το πολύ τρεις υποπεριοχές πρόσδεσης. Εξάιρεση αποτελεί ο *pdUppA-3'-p*, ο ισχυρότερος μικρού μοριακού βάρους αναστολέας της RNase A μέχρι σήμερα, ο οποίος καταλαμβάνει τις P0-B1-P1-B2-P2 υποπεριοχές του ενζύμου (Leonidas et al. 1999). Τα ανάλογα νουκλεοζιτών, δεν διαθέτουν φωσφορική ομάδα, παρόλα αυτά αναστέλλουν την ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της RNase A με την ίδια αποτελεσματικότητα και συνεπώς των ομόλογων ριβονουκλεασών της που σχετίζονται με τον καρκίνο. Η δομή του συμπλόκου της RNase A με τους αναστολείς, που περιγράφεται σε αυτή τη μελέτη, υποστηρίζει την περαιτέρω ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων των ριβονουκλεασών καθώς και την κρυσταλλογραφική μελέτη τους και την ανάλυση τους με υπολογιστικές προσομοιώσεις.

Βιβλιογραφία

Boix, E., Nikolovski, Z., Moiseyev, G.P., Rosenberg, H.F., Cuchillo, C.M., and Noguis, M.V. 1999. Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. *J. Biol. Chem.* 274: 15605-15614.

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.

Chatani E.Hayashi R.Moriyama H. Ueki T. 2002, Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution, *J. Protein Sci*, 11(1) 72-81.

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.

Damaraju Vijaya L, Sambasivarao Damaraju, James D Young, Stephen A Baldwin, John Mackey, MichaelB Sawyer and CarolE Cass, 2003. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy Nature Publishing Group, *Oncogene* 22, 7524–7536 .

Debnath Joy, Swagata Dasgupta, and Tanmaya Pathak,2012. Dinucleosides with Non-Natural Backbones: A New Class of Ribonuclease A and Angiogenin Inhibitors *Chem. Eur. J.*18 (6): p.1618-27.

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.

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.

Lewin Benjamin 2004, *Genes* VIII.

Matoušek J. 2001, Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 129, (3), 175-91.

Moussaoui, M., M. V. Nogues, 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.

Leatherbarrow RJ 1998. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK.

Leonidas D.D., Maiti T.K., Samanta A., Dasgupta S., Pathak T., Zographos S.E. & Oikonomakos N.G. 2006. The binding of 3'-N-piperidine-4-carboxyl-3'-deoxy-ara-uridine to ribonuclease A in the crystal. *Bioorg Med Chem* 14, 6055-6064.

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.

Leonidas, D. D.; Shapiro, R.; Irons, L. I.; Russo, N.; Acharya, K. R. 1999. Toward rational design of ribonuclease inhibitors: high-resolution crystal structure of a ribonuclease A complex with a potent 3',5'- pyrophosphate-linked dinucleotide inhibitor. *Biochemistry*, 38, 10287-10297.

Raines R.T. 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98, 1045-1065.

Rosenberg HF. 2008 RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol.* May;83(5):1079-87.

Rosenberg H.F., and Domachowske, J.B. 2001. Eosinophil-derived neurotoxin. *Methods Enzymol* 341:273-286.

Russo, A.; Acharya, K. R.; Shapiro, R. Small molecule inhibitors of RNase A and related enzymes. *Methods Enzymol.* 2001, 341, 629-648.

Samanta Anirban, Demetres D. Leonidas, Swagata Dasgupta, Tanmaya Pathak, Spyros E. Zographos, and Nikos G. Oikonomakos 2009, Morpholino, Piperidino, and Pyrrolidino Derivatives of Pyrimidine Nucleosides as Inhibitors of Ribonuclease A: Synthesis, Biochemical, and Crystallographic Evaluation, *J. Med. Chem.*, 2009, 52 (4), 932-942.

Sela, M. and C. B. Anfinsen (1957). "Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease." *Biochim Biophys Acta* 24(2): 229-235.

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.

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.

Stryer, L., 1997 . *Biochemistry*, 3th ed. W.H. Freeman.

Xiangwei Gao and Zhengping Xu 2008, Mechanisms of action of angiogenin Institute of Biochemistry and Cell Biology, *Acta Biochim Biophys Sin* (2008) 619-624.