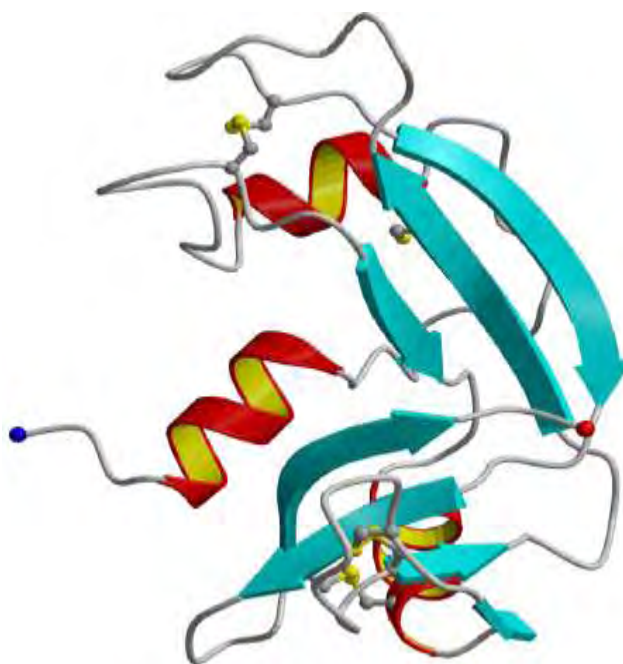




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ
ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ Α (RNaseA)



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ- ΜΠΟΥΓΙΑΤΙΩΤΗ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ -2012

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

Υπεύθυνος Καθηγητής:

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

Τριμελής επιτροπή:

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

Γιαννούλη Σταματίνα, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαντά Στυλιανή, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την τριμελή μου επιτροπή, όπως επίσης και τον επιβλέποντα καθηγητή **κ.Μπαλατσό** (Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) για την επιλογή και ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2011- Ιανουάριος 2012. Οι υποδείξεις και οι συμβουλές τους υπήρξαν καταλυτικές για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Μαραγκοζΐδη για την πολύτιμη βοήθεια και την υπομονή τους.

Περιεχόμενα

ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
Η Παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A).....	7
1.1 Γενικά.....	7
1.2 Η Δομή της RNase A.....	9
1.3 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση	11
1.4 Καταλυτικός μηχανισμός.....	13
1.5 Αναστολείς της RNase A.....	16
1.6 Ενζυμική αναστολή	18
1.7 Καρκίνος και ριβονουκλεάσες	22
1.8 Νουκλεοζίτες.....	24
1.9 Οι νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	25
1.10 Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών	27
1.11 Κρυσταλλογραφία	29
1.12 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών- Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	31
1.13 Στάδια κρυστάλλωσης	33
Σκοπός της εργασίας	34
Αντιδραστήρια-Υλικά	35
Χημικά	35
Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια	36
Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A.....	37
Περιγραφή της μεθόδου	38
Πειραματική διαδικασία	38
Πρότυπη καμπύλη tRNA.....	39

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	40
Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος.....	40
Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και K_i	40
Αποτελέσματα	43
Πρότυπη καμπύλη tRNA.....	43
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	43
Τα συνθετικά ανάλογα νουκλεοσίδια 11VP001, 11VP006 και 11VP009 αναστέλλουν τη δράση της RNase A ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	44
Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών πειραμάτων	48
Η δομή της RNase A στο σύμπλοκο RNase A-11VP001.....	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
Βιβλιογραφία	52

ABSTRACT

Ribonucleases (RNases) are enzymes that catalyze the degradation of RNA either exo- or endonucleolytically. RNases become cytotoxic when they adsorb specifically to certain cells, enter the cytosol, degrade RNA and consequently inhibit protein synthesis leading to cell death. Studies have shown that several pancreatic RNase A homologues, including Angiogenin (Ang), Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN), and eosinophil cationic protein (ECP), utilize their enzymatic activities to bring forth potent physiological effects. This has led to widespread interest and increase in the development of synthetic or natural ribonuclease inhibitors. Herein, we present kinetic and in *silico* data for the effective binding and inhibition of three novel nucleoside analogues on RNase A activity. Complex structures reveal that each inhibitor binds in the RNase A active site. Comparative structural analysis of the RNase A, EDN, ECP and Ang complexes with these and other phosphonucleotide inhibitors, provides a wealth of information for structure-based design of potent ribonucleolytic inhibitors specific for each RNase homologue. These ribonucleolytic inhibitors could serve as templates for the synthesis of efficient regulators of RNase A activity.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ένζυμα που καταλύουν τον αποπολυμερισμό του RNA, είτε έξω- είτε ένδο-νουκλεολυτικά. Συγκεκριμένα, η παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RiboNuclease A, RNase A) από βοοειδή είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Τα μέλη της υπερικογένειας της RNase A έχουν προσελκύσει μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον, καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με μια πληθώρα κακοηθειών και μολυσματικών ασθενειών. Γι αυτό το λόγο, προηγούμενες έρευνες στο εργαστήριο έχουν επικεντρωθεί στο σχεδιασμό επιλεκτικών και ισχυρών μορίων-αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούσαν να έχουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση τριών τροποποιημένων νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης στην ενζυμική δράση της RNase A. Λεπτομερής κινητική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα νουκλεοσίδια αυτά συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου, με τιμές K_i σε χαμηλό εύρος μM . Κρυσταλλογραφικές μελέτες απεκάλυψαν πως οι αναστολείς συνδέονται στο ενεργό κέντρο της RNase A. Η RNase A αποτελεί το ιδανικό μοντέλο εξαιτίας του υψηλού βαθμού συντήρησης του καταλυτικού της κέντρου με τα ομόλογα μέλη της, όπως η ανθρώπινη αγγειογενίνη (angiogenin), η οποία εμπλέκεται σε σχηματισμό όγκων στα αιμοφόρα αγγεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Παγκρεατική ριβονουκλεάση Α (RNase A)

1.1 Γενικά

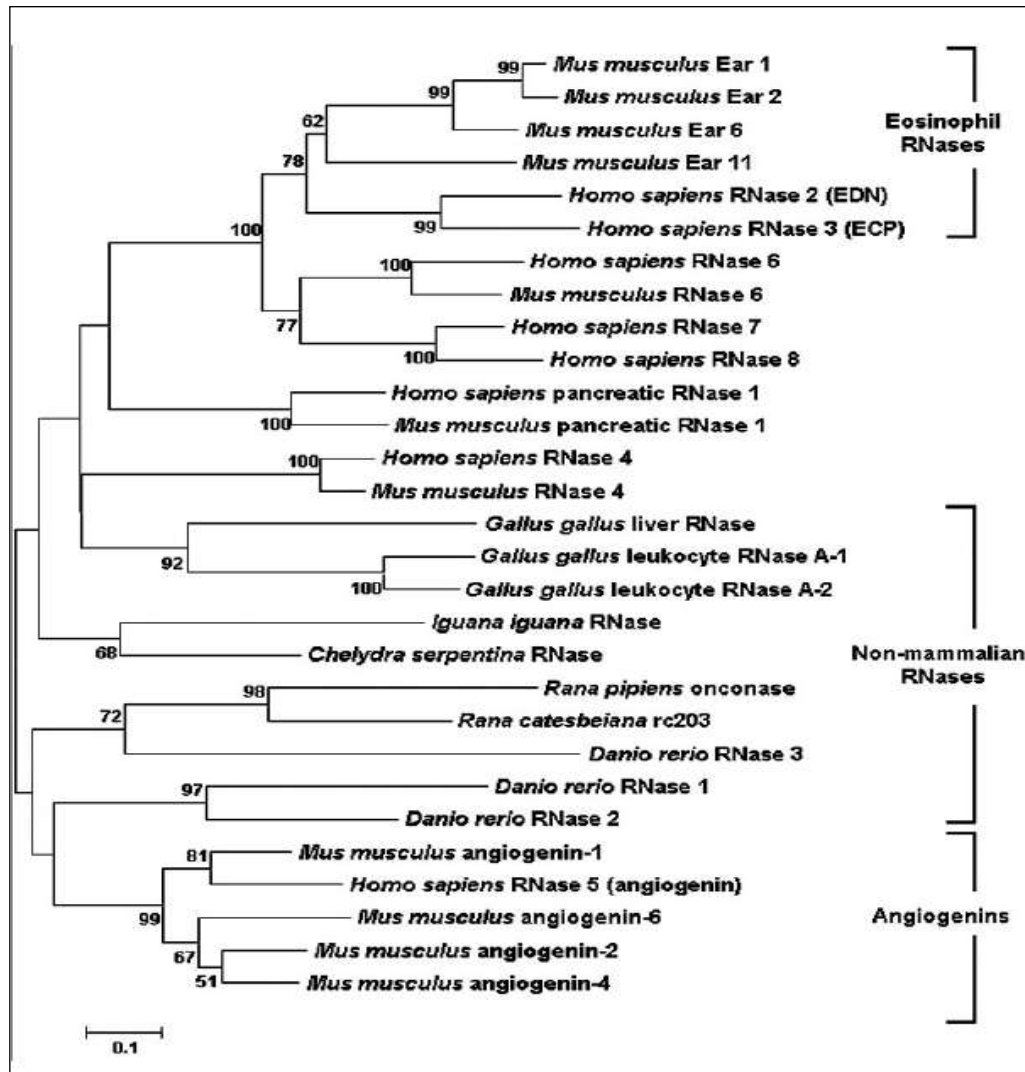
Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α είναι ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών. Πολλά από όσα έχουμε μάθει για τον καταλυτικό της μηχανισμό βοήθησαν στο να καταλάβουμε την εξέλιξη των γονιδίων της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών.

Η ριβονουκλεάση Α αρχικά απομονώθηκε από παγκρεατικό ιστό και ήταν το αγαπημένο θέμα των δομικών και λειτουργικών μελετών από το 1950 έως και το 1960. Σε αυτό συνέβαλε η θερμοσταθερότητα που την χαρακτηρίζει και η σχετικά άφθονη συγκέντρωσή της στον παγκρεατικό ιστό. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13.7 kDa, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφορυλίωσης και μιας υδρόλυσης.

Το 1980 απομονώθηκαν πολλές φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α πρωτεΐνες από άλλους ιστούς. Τα γονιδιά τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και βρέθηκε τελικά ότι παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπεροικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN:ριβονουκλεάση 2) και μερικές άλλες ακόμα κυτταροτοξίνες [Helene F.Rosenberget al,2008]. Ένα φυλογενετικό δέντρο των ριβονουκλεασών αυτής της υπεροικογένειας φαίνεται στην Εικόνα 1.

Όλες οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας στην δραστική τους μορφή έχουν μερικές χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Περιέχουν από 6–8 κατάλληλα τοποθετημένες

κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και όλες έχουν 2 ιστιδίνες και μία λυσίνη, όπου τα παραπάνω παρουσιάζουν ένα σταθερό μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Τέλος, κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπερικογένειας βρίσκονται σε ένα μόνο εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 [Helene F.Rosenberg et al, 2008].



Εικόνα 1 Φυλογενετικό δέντρο της υπερικογένειας της ριβονουκλεάσης A.

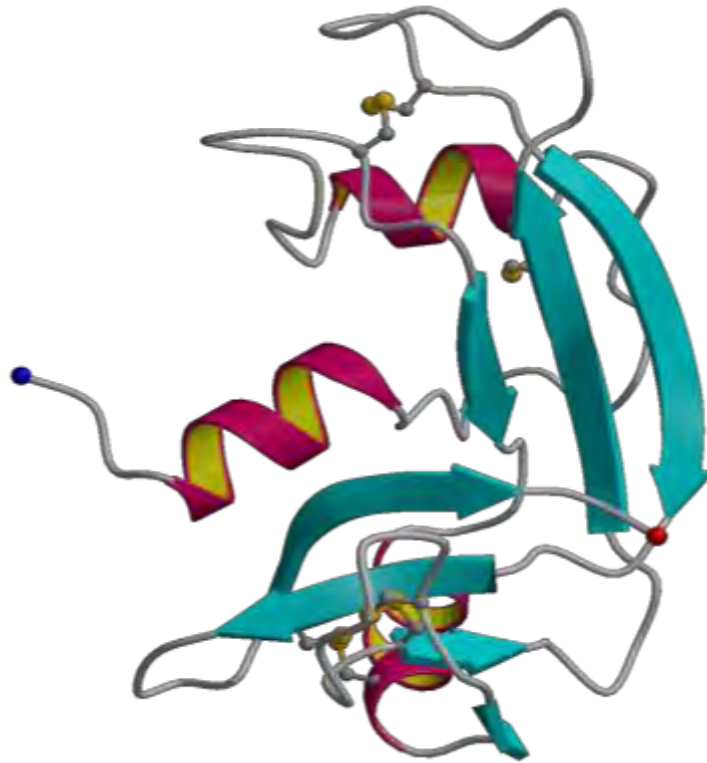
Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A από βοοειδή, κατέχει εξέχουσα θέση στη μοριακή βιολογία. Ήταν το πρώτο ένζυμο και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχίστηκε, ενώ η

κρυσταλλογραφική δομή της προσδιορίστηκε πρίν από πενήντα χρόνια. Έχουν καθοριστεί πάνω από εκατό ομόλογα της RNase A σε όλα τα τετράποδα, ενώ πρόσφατα προσδιορίστηκε μια υπεροικογένεια ριβονουκλεασών στα μηρυκαστικά, στην οποία κατέχει εξέχουσα θέση η RNase A.

Η αξιοσημείωτη σταθερότητα του ενζύμου και η δυνατότητα να απομονώνεται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες, το καθιστά ένα ιδιαίτερα κατάλληλο μοντέλο για μελέτες πρωτεϊνών. Η ριβονουκλεάση A αποτέλεσε το πρώτο μοντέλο πρωτεΐνης για πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους προσδιορισμού δομής. Χρησιμοποιήθηκε από τον Christian Anfinsen για να αποδείξει ότι η αλληλουχία των 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.

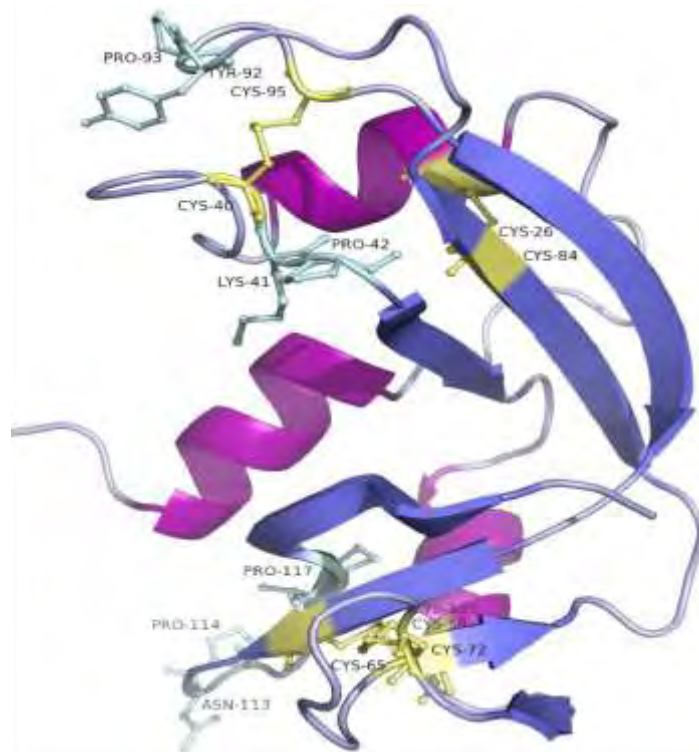
1.2 Η Δομή της RNase A

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 μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 13.686 Da, ενώ η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά.



Εικόνα 2 Η δομή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α

Η δευτεροταγής δομή της RNase A (Εικόνα 2) αποτελείται από τρεις α -έλικες και επτά αντιπαράλληλα β -φύλλα, ενώ σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ 8 καταλοίπων Cys : 26-84, 40-95, 58-110, 67-72.. Το N-τελικό της 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 δυο β -φύλλα και περιέχει κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα σε αντίθεση με το N-τελικό άκρο.



Εικόνα 3 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και οι πεπτιδικοί X-Pro της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A

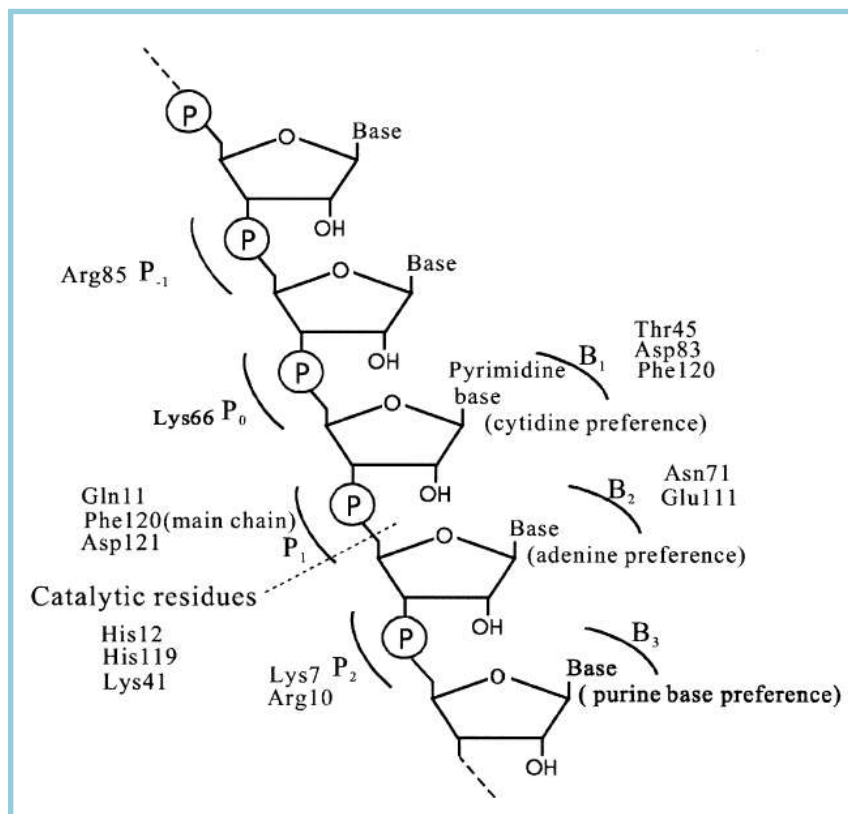
1.3 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση

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

Το 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, 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, είχε ως

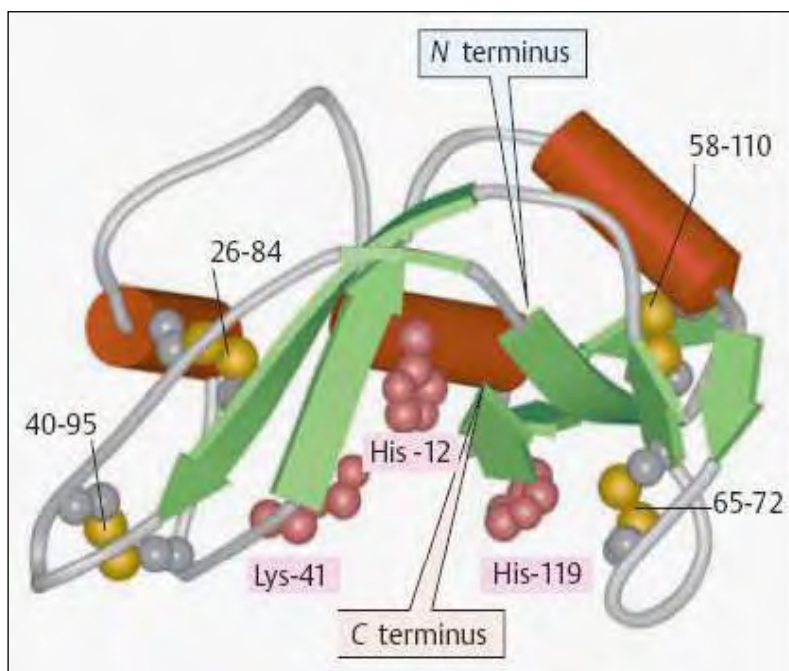
αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, αλλά και την αποσταθεροποίησή του, γεγονός που αποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο των δυο αυτών καταλοίπων στη λειτουργία της ενδονουκλεάσης.

Ένα όχι πρωτεύον αλλά εξίσου σημαντικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου είναι η Thr 45. Το κατάλοιπο αυτό δε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική δράση του ενζύμου, αλλά έχει πολλαπλούς ρόλους, τόσο στην ειδικότητα του ενζύμου για τα νουκλεοτίδια, όσο και για την αναδιοργάνωση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η Thr 45 έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μια 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).



Εικόνα 4 Απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος

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. Έτσι, εκτός από το υποκέντρο p_1 , που αποτελεί το ενεργό κέντρο, υπάρχουν δύο ακόμα υποκέντρα, το p_2 που περιλαμβάνει τα βασικά κατάλοιπα Lys 7 και Arg 10 και το p_0 που περιλαμβάνει την Lys 66 (Εικόνα 4). Στο p_2 προσδέονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής, ενώ στο p_0 προσδέονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του υποκέντρου p_2 είναι σημαντικές τόσο στην κατάλυση όσο και στη δραστικότητα ενδονουκλεάσης, ενώ το υποκέντρο p_0 συνεισφέρει μόνο στην πρόσδεση του RNA.



Εικόνα 5 Το καταλυτικό κέντρο της RNase A

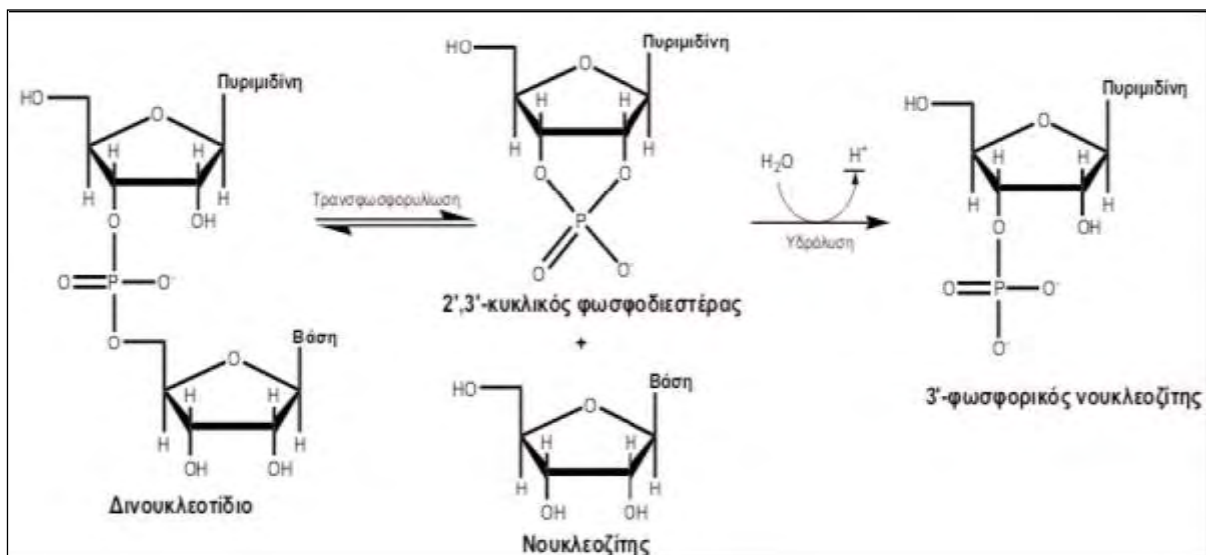
1.4 Καταλυτικός μηχανισμός

Όπως έχει προαναφερθεί, η ριβονουκλεάση A καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA. Η υδρόλυση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα (Εικόνα 6). 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, 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 υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα [Mohamed Moussaoui et al,1998].

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης 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.

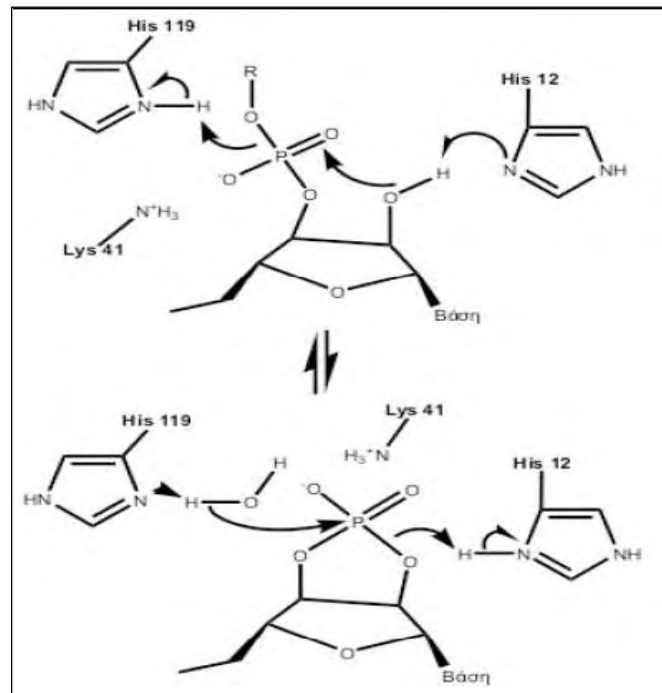


Εικόνα 6 Η αντίδραση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση Α

Όπως είδαμε, τα κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys41 (Εικόνα 7). Η αντίδραση αρχίζει 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 πρωτόνιό της στο 5'-Ο, και το 2'-Ο σχηματίζει δεσμό με το Ρ, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ Ρ και του 5'-Ο διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο Ο. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του Ρ και του 2'-Ο 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'-Ο 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 γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-Ο βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο Ο από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται [Stryer et al,2002].

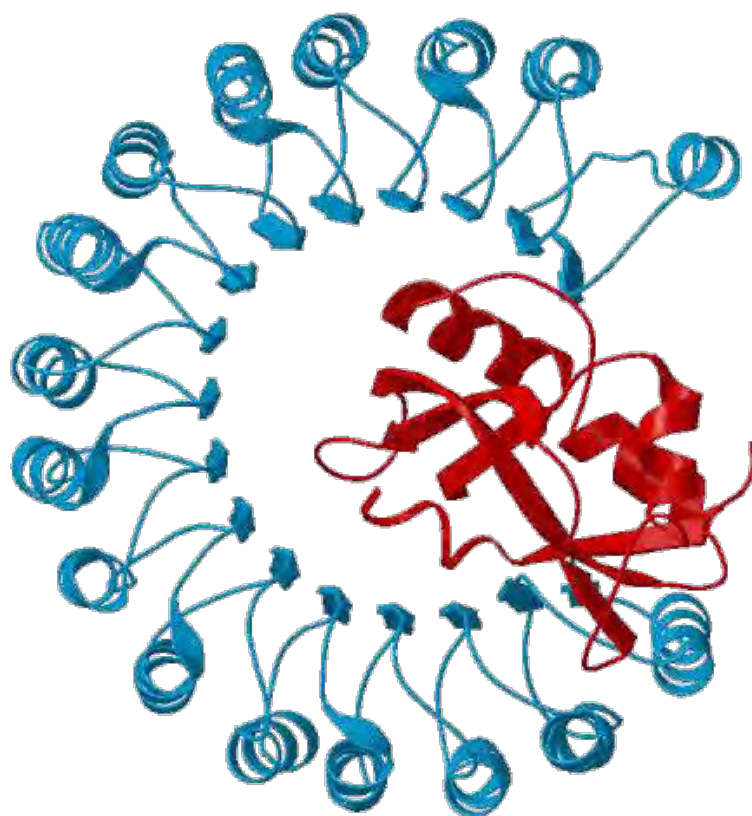


Εικόνα 7 Ο μηχανισμός κατάλυσης

1.5 Αναστολείς της RNase A

Έχουν γίνει πολλές κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες προκειμένου να προσδιοριστούν αποτελεσματικοί αναστολείς. Ο κυριότερος αναστολέας της ριβονουκλεάσης A είναι ο φυσικός αναστολέας ριβονουκλεάσης (RI-ribonuclease inhibitor), μια πρωτεΐνη 50kDa, η οποία προστατεύει το κυτταροπλασματικό RNA από τυχόν παγκρεατικές ριβονουκλεάσες (Εικόνα 8). Η τιμή της K_i για το σύμπλοκο RI-RNase A είναι $4,4 \cdot 10^{-14}$ M [Lee et al,1989] και $6,7 \cdot 10^{-14}$ M [Vincentini et al,1990].

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



Εικόνα 8 Η δομή του συμπλόκου RI-RNase A

Μελετήθηκαν, επίσης, μονονουκλεοτίδια και δινουκλεοτίδια της 5'-πυροφωσφορικής αδενοσίνης ως αναστολείς (Leonidas et al.1997,1999, Russo et al. 1997, Russo and Shapiro.1999, Jardine et al.2001). Η ανάπτυξη τους βασίστηκε στην παρατήρηση ότι το 5'-ADP (ppA, $K_i=1.2\mu\text{M}$) προσδένεται 67 φορές πιο ισχυρά στην ριβονουκλεάση από το 5'-AMP (pA). Οι τιμές των K_i των συμπλόκων βρέθηκαν ίσες με $0.24\mu\text{M}$ και $0.52\mu\text{M}$ αντίστοιχα [Leonidas et al.1997,1999, Russo et al. 1997].

Στην συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές της ριβονουκλεάσης A με τον ppA-3'-p και τον ppA-2'-p, στις οποίες βασίστηκε ο σχεδιασμός ενώσεων με ισχυρότερη πρόσδεση (Leonidas et al.1997). Αργότερα δοκιμάστηκαν ο dUpp-A-3'-p(5'-φωσφο-2'-δεοξυουριδίνη 3'-πυροφωσφορικός $P^2\rightarrow 5'$ εστέρας με 3'-φωσφορική αδενοσίνη) και ο αντίστοιχος εστέρας με ουριδίνη (Leonidas et al,1999). Η συγγένεια

του dUpp-A-3'-p και του U2'pp-A-3'-p με την ριβονουκλεάση ήταν δύο φορές μεγαλύτερη από αυτή της ppA-3'-p σε pH 5.9. Η καθοριστική συμβολή του pH στην πρόσδεση ευνοούσε μόνο την πρόσδεση του νουκλεοτιδίου 3'→5' και έτσι μόνο αυτό χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω βελτίωση. Μελέτες μοντελισμού του συμπλόκου ριβονουκλεάσης A - dUpp-A-3'-p υποδήλωνε ότι η επέκταση του αναστολέα κατά μία 5'-φώσφορική ομάδα θα δημιουργούσε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με την P₁ υποπεριοχή. Η K_i του pdUpp-A-3'-p (27nM) όντως βρέθηκε αρκετά μικρότερη από αυτή του dUpp-A-3'-p [Leonidas et al.1999, Russo and Shapiro,1999].

Πρόσφατα, μια νέα τάξη αναλόγων νουκλεοσιδίων αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της RNase A, με διαφορετικό μηχανισμό αναστολής. Πρόκειται για 5'-δεόξυ-5' μορφόλινο, πιπερίδιο και πυρολίδιο συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ενζυμική δράση της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής με σταθερά αναστολής 103 μM.

Η μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έδειξε πως όλοι οι αναστολείς προσδένονται στην RNase A προσδένοντας τη φωσφορική τους ομάδα μακριά από το ενεργό κέντρο p₁ και κοντά στην υπομονάδα p₀. Η χρήση συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων δεν είναι τυχαία, καθώς έχει δειχθεί πως έχουν αντικαρκινική δράση και για ορισμένα από αυτά έχει βρεθεί πως ένας τουλάχιστον μοριακός στόχος είναι μια εξωνουκλεάση.

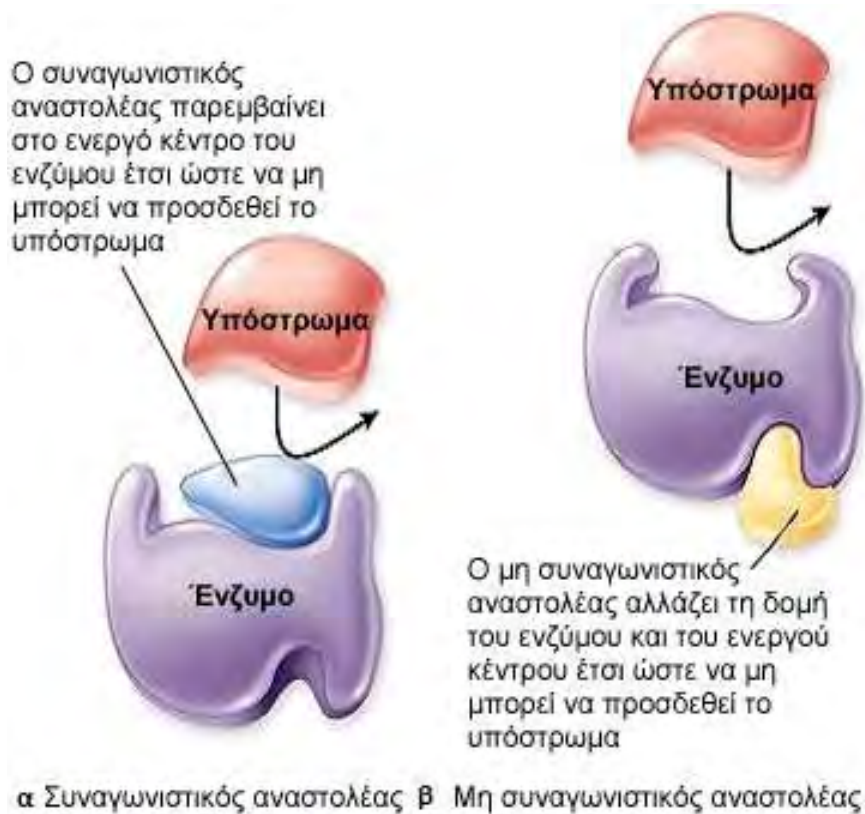
1.6 Ενζυμική αναστολή

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.

Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υποστρώματα

(σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 9). Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα στο υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης.

Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ένα πιο περίπλοκο σχήμα, που ονομάζεται μεικτή αναστολή παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

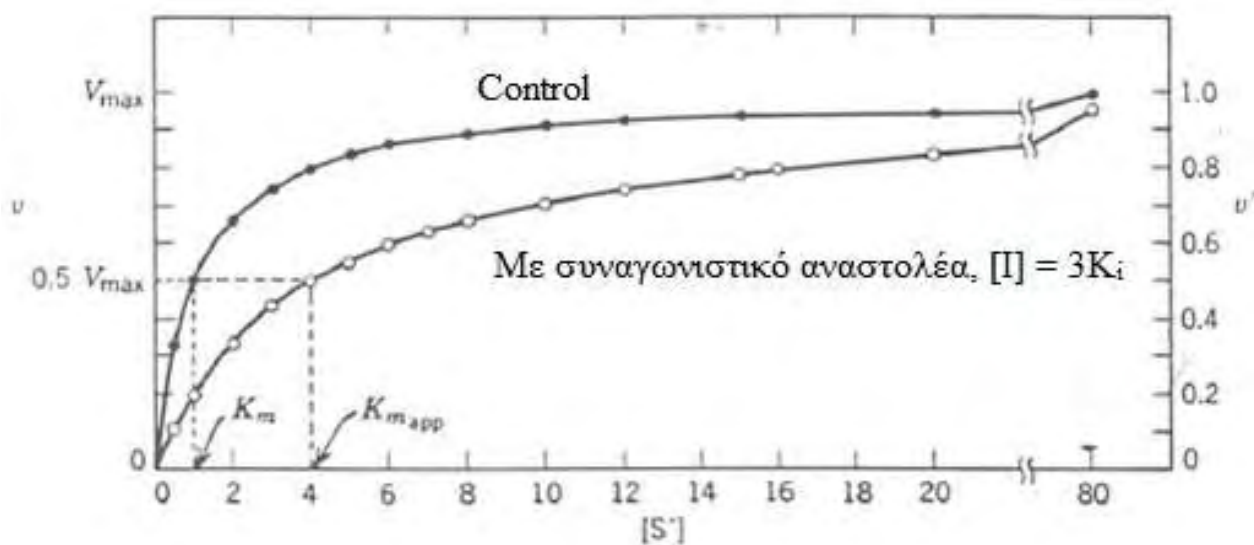


Εικόνα 9 α) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, β) Μη συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα σε άλλη θέση και όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αλλάζει η δομή του ενζύμου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

Προκειμένου να γίνει μια διάκριση στο είδος της αναστολής θα πρέπει να γίνουν κινητικές μελέτες. Ουσιαστικά θα πρέπει να γίνουν οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά αναστολής (K_i) δίνεται από τη σχέση: $K_i = [E][I]/[EI]$. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή (V_{max}), διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M , που καλείται K_M^{app} είναι αριθμητικά ίση με

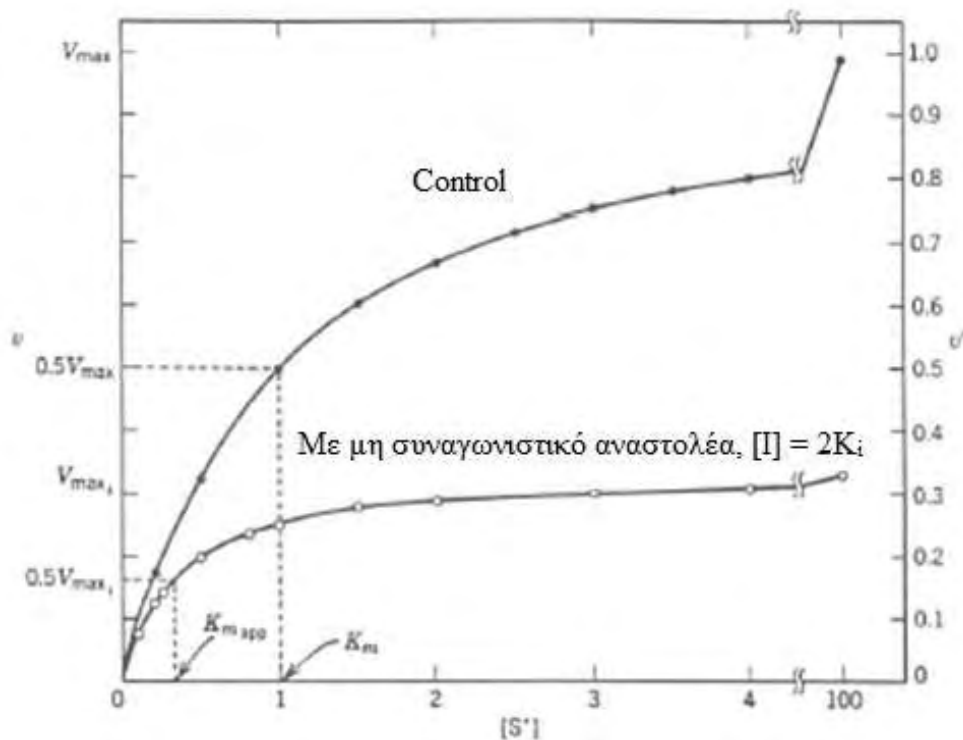
$$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_i),$$

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



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

Στη μη συναγωνιστική αναστολή (Εικόνα 11), το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου – αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου–αναστολέα – υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M . Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



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

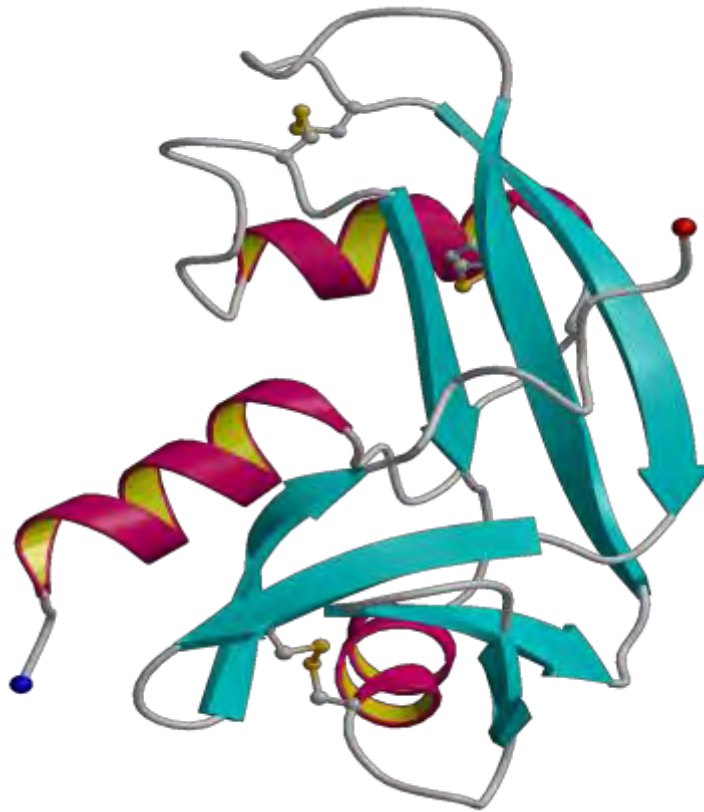
1.7 Καρκίνος και ριβονουκλεάσες

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

Από την άλλη, αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη (Εικόνα 10) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων, καθώς προωθεί την αγγειογένεση (Fett et al., 1987). Ουσιαστικά με την αγγειογένεση επιτυγχάνεται η τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Ταυτόχρονα διευκολύνεται και η κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων. Η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Επομένως, αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao et al., 2002 & Olson et al., 2002). Αντίστοιχα, μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την δράση του ενζύμου, ενισχύουν την δραστηριότητα της αγγειογένεσης (Bond et al, 1990; Curran et al, 1993; Hallahan et al, 1992; Rybak et al, 1989; Shapiro et al, 1989).

Αντιλαμβανόμαστε ότι οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον καρκίνο. Το σκεπτικό για την χρήση των ριβονουκλεασών χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η ιδιότητα τους ως κυτταροτοξικοί παράγοντες των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας κατηγορίας ‘φυσικών’ φαρμάκων ενάντια διαφόρων τύπων καρκίνου, χωρίς τις παρενέργειες της τυποποιημένης χημειοθεραπείας (Ronald Raines, 1998). Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα θα γίνει χορήγηση των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση, οι οποίες δε δεσμεύονται από τον πρωτεϊνικό αναστολέα RI, οδηγώντας στην καταστολή του όγκου.

Προκειμένου να δημιουργήσουμε αναστολείς της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως “μοντέλο” την ριβονουκλεάση A, καθώς εμφανίζει μεγάλη αμινοξική και δομική ομολογία με την αγγειογενίνη ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100% (Εικόνα 12). Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς της αγγειογενίνης. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Leonidas et al.2003).



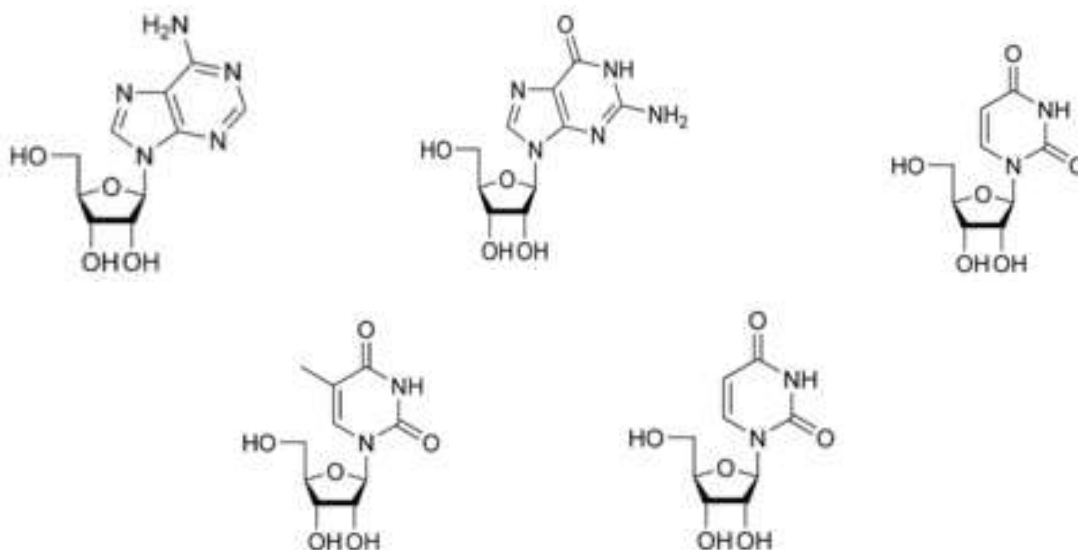
Εικόνα 12 Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης

1.8 Νουκλεοζίτες

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

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της

δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης, διότι η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Μερικά παραδείγματα νουκλεοζιτών φαίνονται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13 Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη)

1.9 Οι νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά νουκλεοζιτών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους καθώς τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιαρκικούς παράγοντες. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αντιοξειδωτικά. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντικρκινική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες.

Προκειμένου να διερευνηθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες καθώς παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες. Αυτές τους οι ιδιότητες τους καθιστούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Agelis *et al*, 2008; Agelis *et al*, 2007; Manta *et al*, 2010; Manta *et al*; 2009, Manta *et al*, 2009; Komiotis *et al*, 2008;). Έχει διαπιστωθεί η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Ακόμη, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα (Halliwell B. 2001).

Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στην ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου. Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων, που έχουν ήδη εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), παρουσίασε ότι οι νουκλεοζίτες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1- β -D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (**araC**), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο- β -D-ερυθροπεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (**DMDC**), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους.

1.10 Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών, όπως είναι γνωστό, πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα .

Τα αντικαρκινικά και τα αντικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον

κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ικές πολυμεράσες. Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ικό γονιδίωμα από τις ικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

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

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

νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες,. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.

1.11 Κρυσταλλογραφία

Η κρυσταλλογραφία ξεκίνησε αρχικά ως η επιστήμη που ασχολούνταν με τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων κρυσταλλικών μορφών της ύλης και αποτελούσε κλάδο της γεωλογίας και ειδικότερα της ορυκτολογίας. Ως κρύσταλλος χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε στερεό που παρουσιάζει κανονική γεωμετρική διάταξη των δομικών του μερών. Τα δομικά μέρη ενός κρυστάλλου (άτομα, ιόντα ή μόρια) σχηματίζουν συνδεδεμένα ένα κρυσταλλικό πλέγμα, που μεγαλώνει κάθε φορά που προστίθεται σ' αυτό νέα ποσότητα δομικών μερών. Από τη γεωμετρία του κρυσταλλικού πλέγματος εξαρτάται και το σχήμα αλλά και οι φυσικές ιδιότητες του κρυστάλλου. Η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών αναπτύχθηκε το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα για τρεις κυρίως λόγους: (α) χρησιμοποιήθηκε σαν μέσο για τον καθορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ακάθαρτα μίγματα, την εποχή που δεν υπήρχαν πολλές μέθοδοι καθαρισμού πρωτεϊνών, (β) χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν μια πρωτεΐνη ήταν καθαρή και (γ) ήταν ένα αξιοπερίεργο εργαστηριακό αντικείμενο. Οι δύο πρώτοι λόγοι αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την προώθηση της κρυσταλλογραφίας τον 19ο αιώνα και οι βιοχημικοί, όπως ο Osbone, τη χρησιμοποίησαν κατά κόρον για να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν πρωτεΐνες. Αυτοί οι πρώτοι ερευνητές έδωσαν τα πρώτα στοιχεία για την ανάπτυξη κρυστάλλων, τα οποία χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα (McPherson, 2004).

Οι ακτίνες X ανακαλύφθηκαν από τον Röntgen το 1895. Την ανακάλυψη τους ακολούθησε εκτεταμένη μελέτη των ιδιοτήτων τους. Το 1912 ο M.v. Laue προέβλεψε ότι οι ακτίνες X θα μπορούσαν να υποστούν περίθλαση από κρυστάλλους, αν οι κρύσταλλοι αποτελούνται από κανονική (περιοδική) επανάληψη ατόμων (παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται στην περίθλαση του φωτός από φράγματα συμβολής). Η πρόβλεψη του Laue επαληθεύθηκε πειραματικά λίγο αργότερα από τους Friedrich και Knipping. Την ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων X από κρυστάλλους,

σύντομα ακολούθησαν οι έρευνες των W.H. και W.L Bragg και η μελέτη του φαινομένου απλοποιήθηκε με την εισαγωγή από τον W.L Bragg της ιδέας της «ανάκλασης» των ακτίνων X από κρυσταλλικά επίπεδα.

Η ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων X σημείωσε τη γέννηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, μεθοδολογίας που χρησιμοποιεί τα διαγράμματα περίθλασης για την αποκάλυψη των ατομικών θέσεων σε ένα κρύσταλλο. Η επιτυχία της μεθόδου σε βιολογικά μόρια στη δεκαετία 1950-60, έπαιξε σπουδαίο ρόλο στις θεματικές προόδους που σημειώθηκαν στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας. Το 1953 ο M. Perutz και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι η ισόμορφη προσκόλληση «βαριών» ατόμων σε μόρια αιμοσφαιρίνης, σε μονοκρυστάλλους, προκαλούσε μεταβολές στις εντάσεις των περιθλωμένων ακτίνων X που μπορούσαν να μετρηθούν. Αυτή η σπουδαία ανακάλυψη έδειξε ότι ήταν δυνατό, κατ' αρχή, να καθοριστεί η δομή μιας σφαιρικής πρωτεΐνης. Εφαρμογή της μεθόδου στη μυοσφαιρίνη από τον J. Kendrew και τους συνεργάτες του (1957) είχε σαν αποτέλεσμα τον πρώτο καθορισμό της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης. Τον προσδιορισμό της μυοσφαιρίνης ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της αιμοσφαιρίνης από τον M. Perutz και τους συνεργάτες του (1959). Λίγο αργότερα (1966) ο Sir D.C. Philips και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν για πρώτη φορά τη δομή ενός ενζύμου, της λυσοζύμης, και πρότειναν ένα μηχανισμό για την καταλυτική του δράση.

Το 1953 οι J. Watson και F. Crick πρότειναν τη σήμερα περίφημη δομή της διπλής έλικας για το μόριο του DNA. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που τους οδήγησαν σε αυτή την πρόταση υπήρξαν οι μελέτες με περίθλαση ακτίνων X του DNA που έγιναν από τους M. Wilkins και R. Franklin. Η λεπτομέρης ανάλυση των διαγραμμάτων περίθλασης από τον M. Wilkins και τους συνεργάτες του από τότε, επιβεβαίωσε τη δομή των Watson και Crick, (β -DNA). Η περίθλαση ακτίνων X έδωσε επίσης πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή των ιών και η πρώτη δομή που προσδιορίστηκε ήταν αυτή ενός ιού της τομάτας (tomato bushy stunt virus) από τον S. Harrison (1978). Πιο πρόσφατα, πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών πάρθηκαν από τον προσδιορισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών και η πρώτη πρωτεΐνη από κυτταρικές μεμβράνες ήταν το κέντρο της

φωτοσυνθετικής αντίδρασης από τους Hartmut Michel, Johann Deisenhofer and Robert Huber το 1985. Για τις μελέτες τους τιμήθηκαν το 1989 με το βραβείο Nobel.

Μια σημαντική εξέλιξη στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών προήλθε από την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA τη δεκαετία του 1980. Οι τεχνολογίες του ανασυνδυασμένου DNA και της ετερόλογης έκφρασης επέτρεψε στους επιστήμονες να παράγουν επαρκείς ποσότητες σπάνιων πρωτεϊνών. Σήμερα, η πλειονότητα των πρωτεϊνών που μελετώνται με περίθλαση ακτίνων-X προέρχονται από ετερόλογη έκφραση. Μια άλλη συνέπεια είναι ότι πλέον χρησιμοποιούμε ομογενή πρωτεϊνικά δείγματα τα οποία εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα. Αυτό έδωσε μεγάλη ώθηση στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, διεύρυνε το πεδίο εφαρμογών της και τη χρήση της από τους βιοχημικούς και τους μοριακούς βιολόγους.

1.12 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών- Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Οι χημικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις ατόμων ή μορίων, τα οποία δεν είναι τίποτε άλλο από τρισδιάστατα αντικείμενα-δομές. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης (Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998).

Ένας κρύσταλλος αναπτύσσεται όταν ένα σύστημα ασύμμετρων αντικειμένων επιλέξει αυθόρμητα να μειώσει τους βαθμούς ελευθερίας του και να διαταχθεί με ακρίβεια σε ένα σταθερό πλέγμα. Αυτό όμως, φαίνεται να έρχεται σε σύγκρουση με το νόμο της εντροπίας, που θέλει την εντροπία να αυξάνεται συνεχώς. Η κρυστάλλωση μορίων είναι ένα αντιστρεπτό φαινόμενο ισορροπίας και οι συγκεκριμένες κάθε φορά κινητικές και θερμοδυναμικές παραμέτροι εξαρτώνται από

τις χημικές και φυσικές ιδιότητες τόσο του διαλύτη όσο και της προς κρυστάλλωση ουσίας. Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεής και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος. Τα μεμονωμένα μόρια χάνουν βαθμούς ελευθερίας από τις μεταφορικές κινήσεις, με αποτέλεσμα να μειώνεται η εντροπία του συστήματος, ταυτόχρονα όμως σχηματίζονται πολλοί νέοι δεσμοί ελαττώνοντας την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Αυτή η ελάττωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος είναι η κινητήρια δύναμη που οδηγεί τη διεργασία σχηματισμού κρυστάλλων. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δύο φάσεις και δίνεται από την σχέση:

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{io} + RT \ln \gamma c_i$$

όπου μ_{io} , μ_{is} και μ_{ic} είναι τα χημικά δυναμικά στον κρύσταλλο, στο διάλυμα και το πρότυπο δυναμικό αντίστοιχα, ενώ γ είναι η ενεργότητα και c η συγκέντρωση (Ρακιντζή, 1994).

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού i στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ότι στον κρύσταλλο, και εκφράζεται με την παράμετρο β η οποία ονομάζεται βαθμός υπερκορεσμού και ορίζεται ως εξής:

$$\beta = c / c_s$$

όπου c η συγκέντρωση και c_s η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση, ο βαθμός υπερκορεσμού κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 10 ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος (Mikol & Giege, 1992).

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια:

Ασταθής κατάσταση: όπου επιτυγχάνεται η αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξή τους.

Μετασταθής κατάσταση: όπου αναπτύσσονται οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι αλλά δεν δημιουργούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης.

Κατά την κρυστάλλωση υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα, αντί μιας σαφώς διατεταγμένης κρυσταλλικής δομής. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους μόρια και να διευθετηθούν κατάλληλα (McPherson, 1999).

1.13 Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό, ίσως, σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων δεν είναι μία εύκολη διαδικασία. Πιστεύεται ότι είναι μία τέχνη η οποία συνδυάζεται άρρηκτα με την επιστήμη. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και έτη). Γι αυτό απαιτείται προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους (Acharya & Rees, 1997). Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

- i. την πυρήνωση
- ii. την ανάπτυξη
- iii. την αναστολή της ανάπτυξης των πυρήνων

Σκοπός της εργασίας

Η αξιοσημείωτη σταθερότητα καθώς και η ευκολία καθαρισμού της, έχουν καταστήσει την RNase A ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη πρωτεϊνών. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου με άλλα μέλη της υπεροικογένειας, όπως η αγγειογενίνη, οδήγησε στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων, όπως συνθετικά νουκλεοσίδια, που αναστέλλουν τη δράση της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη της σύνδεσης των αναλόγων νουκλεοζιτών πυριμιδίνης (ουρακίλη) στην παγκρεατική ριβονουκλεάση A. Η μελέτη περιλαμβάνει κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα. Τα κινητικά πειράματα διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής στην κατεύθυνση υδρόλυσης του υποστρώματος (tRNA).

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες περιλαμβάνουν τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X από κρυστάλλους των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, τον προσδιορισμό και την ανάλυση του συμπλόκου.

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται, μέρος της οποίας είναι και η παρούσα εργασία, είναι η κατανόηση της μοριακής αναγνώρισης μικρών μορίων από τις ριβονουκλεάσες, που αποτελούν ενζυμικούς "στόχους" βιο-ιατρικού ενδιαφέροντος και η αξιοποίηση αυτής της γνώσης στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει ογκοκατασταλτικών φαρμάκων.

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 της λειτουργίας, αλλά και των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση του αναστολέα. Η τρισδιάστατη (3D) δομή παρέχει άμεσες πληροφορίες για το πώς τα υποστρώματα ή οι ενζυμικοί αναστολείς συνδέονται στα ειδικά κέντρα σύνδεσης μακρομορίων. Επομένως, η γνώση της τρισδιάστατης δομής, οδηγεί στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μακρομοριακού στόχου και μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό νέων και πλέον ενεργών φαρμάκων.

Αντιδραστήρια-Υλικά

Αντιδραστήρια

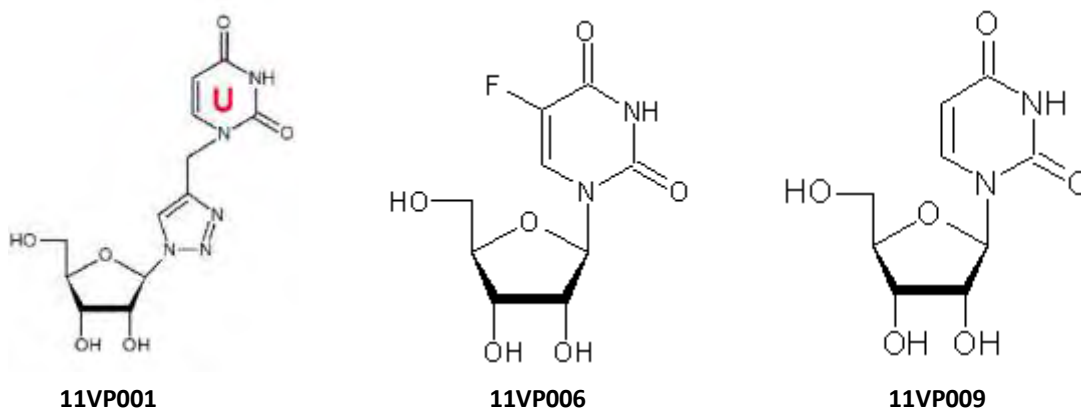
- ❖ Βοεΐα παγκρεατική ριβονουκλεάση A (type XII-A). Εταιρία Sigma-Aldrich (Athens, Greece).
- ❖ Ribonucleic acid transfer baker's yeast . Εταιρία Sigma-Aldrich (Athens, Greece).
- ❖ Ρυθμιστικά διαλύματα :
 - Οξικό οξύ [CH_3COOH]/ οξικό νάτριο [$\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2$], το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα κινητικά πειράματα σε συγκέντρωση 0,1 M και $\text{pH}=6$, προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH , αλλά και η ιοντική ισχύς. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα χρήσης, δηλαδή ως το διάλυμα στο οποίο διαλύεται το ένζυμο RNase A.
 - Sodium Phosphate (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) σε συγκέντρωση 50mM και $\text{pH}=7,4$, το οποίο αποτέλεσε και το διάλυμα της αντίδρασης (reaction buffer). Να σημειωθεί πως στο διάλυμα αντίδρασης διαλύεται και το υπόστρωμά μας (tRNA).
 - Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution). Χρησιμοποιήθηκαν 40mM Lanthanum Nitrate [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$] και 6% Perchloric acid [HClO_4].

Χημικά

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Reasearch Organics
Acetic acid (100%)	Merck
Sodium acetate	Merck
NaH_2PO_4	Merck
Na_2HPO_4	Merck
Lanthanum Nitrate	Sigma
Perchloric acid (60%)	Fluca

Νουκλεοτίδια και συνθετικοί νουκλεοζίτες

Παρακάτω απεικονίζονται οι δομές των αναλόγων νουκλεοζιτών ουρακίλης που σχεδιάστηκαν και μελετήθηκε κινητικά η επίδρασή τους στη δραστικότητα του ενζύμου RNase A.



Εικόνα 14 Χημικές δομές των αναλόγων νουκλεοζιτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

A) 11VP001 → 1-[(1,2,3-τριαζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-ουρακίλη, Mr=325,28.

B) 11VP006 → 1-(β-D-ριβοφουρανόζυλο)5-φθοροουρακίλη, Mr=262,19

Γ) 11VP009 → 1-(β-D-ριβοφουρανόζυλο) ουρακίλη, Mr=244,2

Οι παραπάνω νουκλεοζίτες συντέθηκαν και παραχωρήθηκαν από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Κομιώτη, (Εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Όργανα-Υλικά

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



Μέθοδοι

Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A

Μέτρηση συγκεντρώσεων

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων του ενζύμου και του υποστρώματος γίνεται φωτομετρικά. Η συγκέντρωση υπολογίζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση} = \text{Απορρόφηση} / \text{Σταθερά απορρόφησης}$$

Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της ριβονουκλεάσης A προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 278 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm (Sela & Anfinsen, 1957- Dostal & Matousek, 1973). Η συγκέντρωση του υποστρώματος tRNA προσδιορίζεται, επίσης, φωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{260} = 9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και θεωρώντας ότι τιμή οπτικής απορρόφησης ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 1,42 μM .

Περιγραφή της μεθόδου

Η δραστικότητα της RNase A προσδιορίστηκε ακολουθώντας μια μέθοδο κατακρήμνισης και έχοντας ως υπόστρωμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Anfinsen et al. (Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954)

Πειραματική διαδικασία

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

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα έξης αντιδραστήρια: 0,2 M NaH₂PO₄ και 0,2 M Na₂HPO₄ με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι : 2μM, 4μM, 5μM, 6μM και 7μM. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 600 μl, ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η RNase A έχει αραιωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa (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 (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα

επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Έπειτα από δοκιμές, συμπεράναμε πως ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης είναι το 1 min. Μετά από 1 min αφού έχει προστεθεί η RNase A , σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 14.500 στροφές (rpm) για 15 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 580μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό), με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν ξεκινήσουμε να φωτομετρούμε τα υπόλοιπα δείγματα που περιέχουν τις αντιδράσεις με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA ,που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Τέλος, τα αποτελέσματα ,που λαμβάνονται μετά τη φωτομέτρηση, επεξεργάζονται στο πρόγραμμα Grafit.

Πρότυπη καμπύλη tRNA

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης RNA ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Μετά την προσθήκη του υποστρώματος στο διάλυμα αντίδρασης, τα δείγματα επώστηκαν για 10 min στους 30°C και έπειτα ακολούθησε φωτομέτρηση στα 260 nm.

Πίνακας 1: Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

Τελική συγκέντρωση tRNA (μM)	τυφλό	0,5	1	1,5	2
tRNA (10 μM)	0 μl	30μl	60μl	90μl	120μl
Διάλυμα αντίδρασης (μl)	600μl	570μl	540μl	510μl	480μl
Απορρόφηση (260 nm)	0	0,122	0,212	0,286	0,344

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °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 stop solution. Έπειτα, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 260 nm.

Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος

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 tRNA 2μM, 4μM, 5μM, 6μM και 7μM.

Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και K_i

Υπολογισμός K_m

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

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

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας

ε : συντελεστής απορρόφησης

λ : μήκος κύματος (278 nm)

[RNase] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

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

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

Το πρόγραμμα GRAFIT χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της K_m και V_{max} της RNase A.

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

Υπολογισμός K_i

Αρχικά, όπως και για τον υπολογισμό της K_m , έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν (0, 2, 4, 5, 6, 7 μM), καθώς επίσης και για διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα (0, 2, 10 και 50 μM). Η ταχύτητα κάθε αντίδρασης υπολογίζεται με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων για τον υπολογισμό της K_i με τη μέθοδο Dixon (Segel, 1975), για την οποία 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 $K_m/(V_{max} \cdot [S] \cdot K_i)$. Εάν ο αναστολέας είναι συναγωνιστικός και είναι γνωστή η V_{max} , μπορεί να σχεδιαστεί μια οριζόντια γραμμή στο ύψος του $1/V_{max}$.

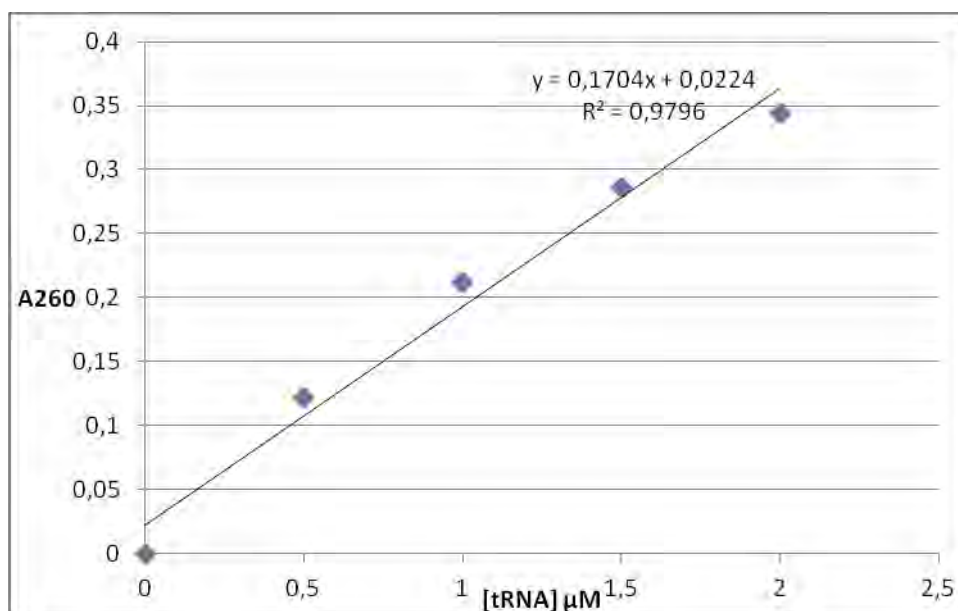
Το πρόγραμμα χρησιμοποιώντας τις ταχύτητες των αντιδράσεων από όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα σχεδιάζει τα γραφήματα. Η απόλυτη τιμή του σημείου τομής των ευθειών αντιστοιχεί στην τιμή της K_i . Εναλλακτικά, η K_i μπορεί να προσδιοριστεί αλγεβρικά. Στο σημείο τομής των ευθειών ισχύει $1/V_1 = 1/V_2$. Από την επίλυση αυτής της εξίσωσης προκύπτει ότι $K_i = -[I]$. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου υπολογίστηκε η τιμή της K_i για καθένα από τα ανάλογα νουκλεοσίδια (11VP001, 11VP006, 11VP009) που μας δόθηκαν.

Αποτελέσματα

Πρότυπη καμπύλη tRNA

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης tRNA ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Όπως προαναφέραμε, έπειτα από την προσθήκη του υποστρώματος στο διάλυμα αντίδρασης, τα δείγματα επωάστηκαν για 10 min στους 30°C και έπειτα ακολούθησε φωτομέτρηση στα 260 nm.

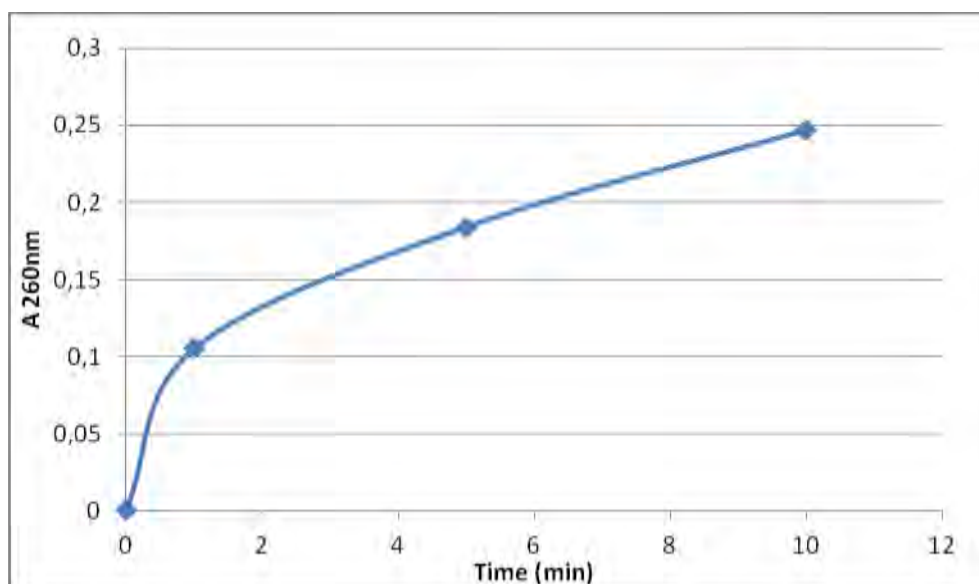
Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται το Διάγραμμα της πρότυπης καμπύλης του tRNA.



Εικόνα 15 Διάγραμμα Πρότυπης καμπύλης tRNA

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

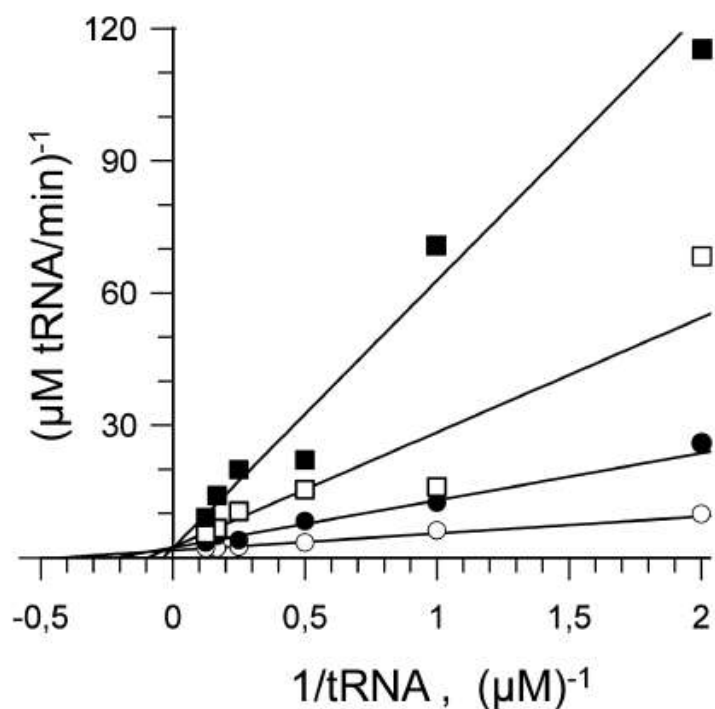
Έχοντας κάνει αρκετές δοκιμές με μεταβαλλόμενες συνθήκες, καθορίστηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου για τα πειραματικά αποτελέσματα η συγκέντρωση 10 nM RNase A, καθώς και βέλτιστος χρόνος αντίδρασης το 1 min. Η χρονοκαμπύλη της ενζυμικής δράσης της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A παρατίθεται στην Εικόνα 16:



Εικόνα 16 Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης της RNase A

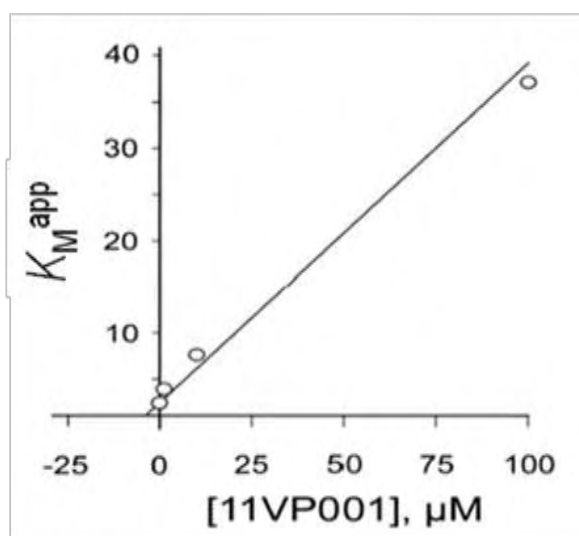
Τα συνθετικά ανάλογα νουκλεοσίδια 11VP001, 11VP006 και 11VP009 αναστέλλουν τη δράση της RNase A ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της RNase A από τα συνθετικά νουκλεοσίδια 1-[(1,2,3-τριάζολο-4-υλο)-β-D-ριβοφουρανόζυλο]-5-ουρακίλη (11VP001), 1-(β-D-ριβοφουρανόζυλο)5-φθοροουρακίλη (11VP006) και 1-(β-D-ριβοφουρανόζυλο)-ουρακίλη (11VP009), πραγματοποιήσαμε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα Lineweaver-Burk έδειξε πως και τα τρία ανάλογα νουκλεοσιδίων που μας δόθηκαν για μελέτη, παρουσιάζουν κινητική συναγωνιστικής αναστολής, όπως φαίνεται και στα επόμενα διαγράμματα.

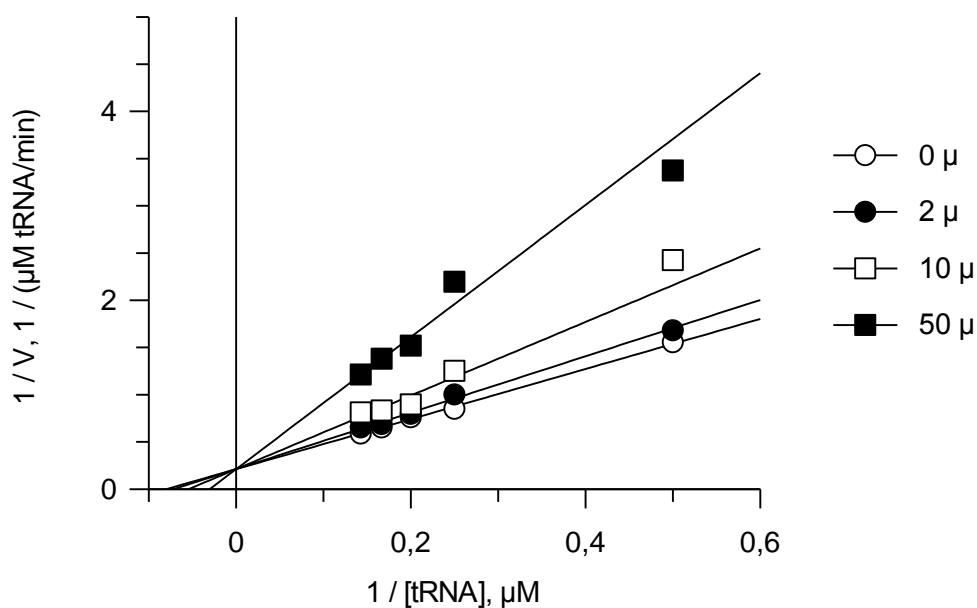


Εικόνα 17 Η ουσία 11VP001 είναι συναγωνιστικός αναστολέας. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου $1/V-1/S$ Lineweaver-Burk απουσία (ανοιχτοί κύκλοι—○—), ή παρουσία 1 μM (μαύροι κύκλοι—●—), 10 μM (ανοιχτά τετράγωνα—□—) και 100 μM (μαύρα τετράγωνα—■—) της ουσίας 11VP001

Στη συνέχεια, για να προσδιορίσουμε τη σταθερά αναστολής (K_i) κινητικά, χρησιμοποιήθηκαν η κλίση των ευθειών των διαγραμμάτων Lineweaver-Burk, καθώς και οι συγκεντρώσεις των νουκλεοσιδίων (1, 10 και 100 μM). Σύμφωνα με τα παραπάνω προέκυψε η τιμή του K_i για το 11VP001 (Διάγραμμα 4).

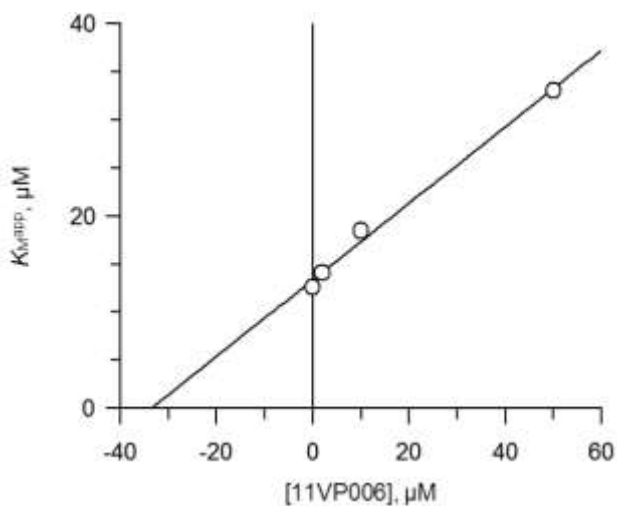


Εικόνα 18 Προσδιορισμός K_i : Οι κλίσεις των ευθειών (K_M/V_{max}) συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων του 11VP001

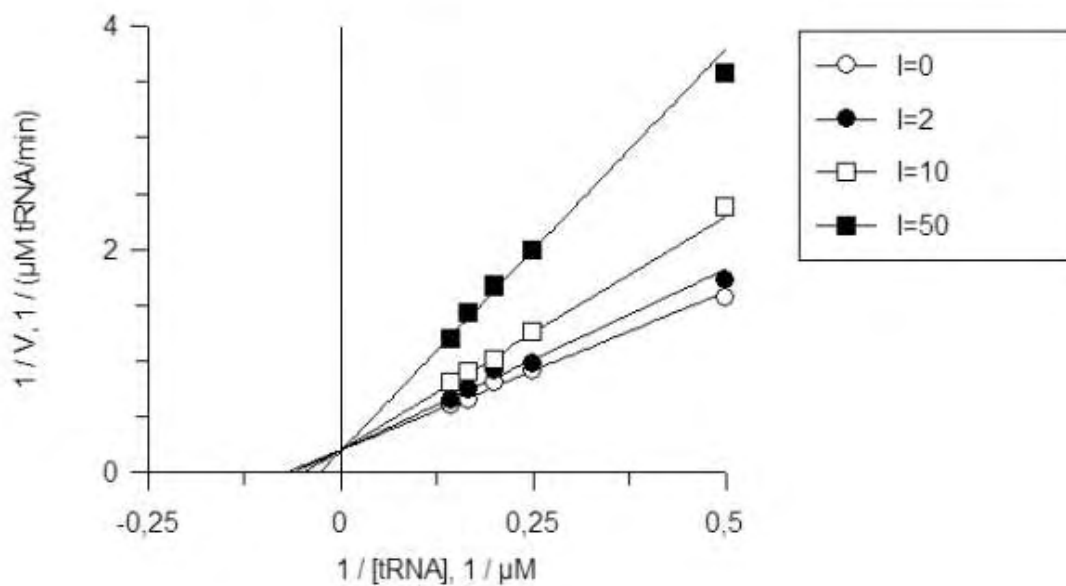


Εικόνα 19 Η ουσία 11VP006 είναι συναγωνιστικός αναστολέας. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου $1/V-1/S$ Lineweaver-Burk απουσία (ανοιχτοί κύκλοι—○—), ή παρουσία 2 μM (μαύροι κύκλοι—●—), 10 μM (ανοιχτά τετράγωνα—□—) και 50 μM (μαύρα τετράγωνα—■—) της ουσίας 11VP006

Με τον τρόπο που αναλύθηκε προηγουμένως προσδιορίστηκε η τιμή της σταθεράς αναστολής (K_i) για την ουσία 11VP006, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21.

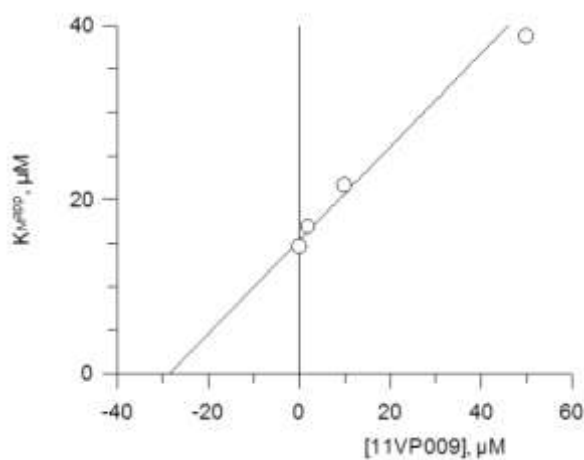


Εικόνα 20 Προσδιορισμός K_i - Οι κλίσεις των ευθειών (K_m/V_{max}) συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων του 11VP006



Εικόνα 21 Η ουσία 11VP009 είναι συναγωνιστικός αναστολέας. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου $1/V-1/S$ Lineweaver-Burk απουσία (ανοιχτοί κύκλοι—○—), ή παρουσία 2 μM (μαύροι κύκλοι—●—), 10 μM (ανοιχτά τετράγωνα—□—) και 50 μM (μαύρα τετράγωνα—■—) της ουσίας 11VP009

Με τον τρόπο που αναλύθηκε προηγουμένως προσδιορίστηκε η τιμή της σταθεράς αναστολής (K_i) για την ουσία 11VP009, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 23.



Εικόνα 22 Προσδιορισμός K_i - Οι κλίσεις των ευθειών (K_m/V_{max}) συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων του 11VP009

Πίνακας 2 : Τιμές σταθεράς αναστολής (K_i) των αναλόγων νουκλεοζιτών

Συνθετικοί νουκλεοζίτες	K_i , μM
11VP001	1,62±0,23
11VP006	33,58±0.62
11VP009	28,51±0,77

Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών πειραμάτων

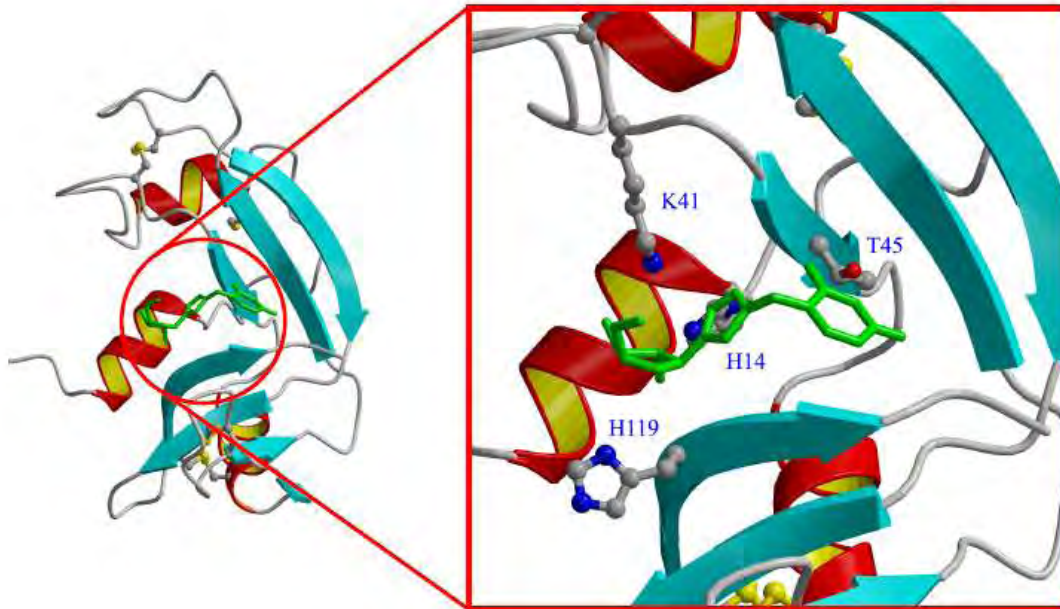
Η δομή της RNase A στο σύμπλοκο RNase A-11VP001

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της ριβονουκλεάσης A με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop). Οι κρύσταλλοι ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου $C2$ ($C 1 2 1$) με διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας και γωνίες για το σύμπλοκο ριβονουκλεάσης A-11VP001 $a=100.442$, $b=32.823$, και $c=72.704$ Å και $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=90.63^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$. Στην ασύμμετρη μονάδα υπάρχουν δύο μόρια ριβονουκλεάσης A και το σύμπλοκο ριβονουκλεάσης A- 11VP001 σχηματίστηκε με εμπλοκή των κρυστάλλων της πρωτεΐνης με διάλυμα 10mM 11VP001 στο διάλυμα κρυστάλλωσης για 48 ώρες. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα περίθλασης ακτίνων X συνελλέγησαν με τη χρήση συμβατικής πηγής ακτίνων X στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

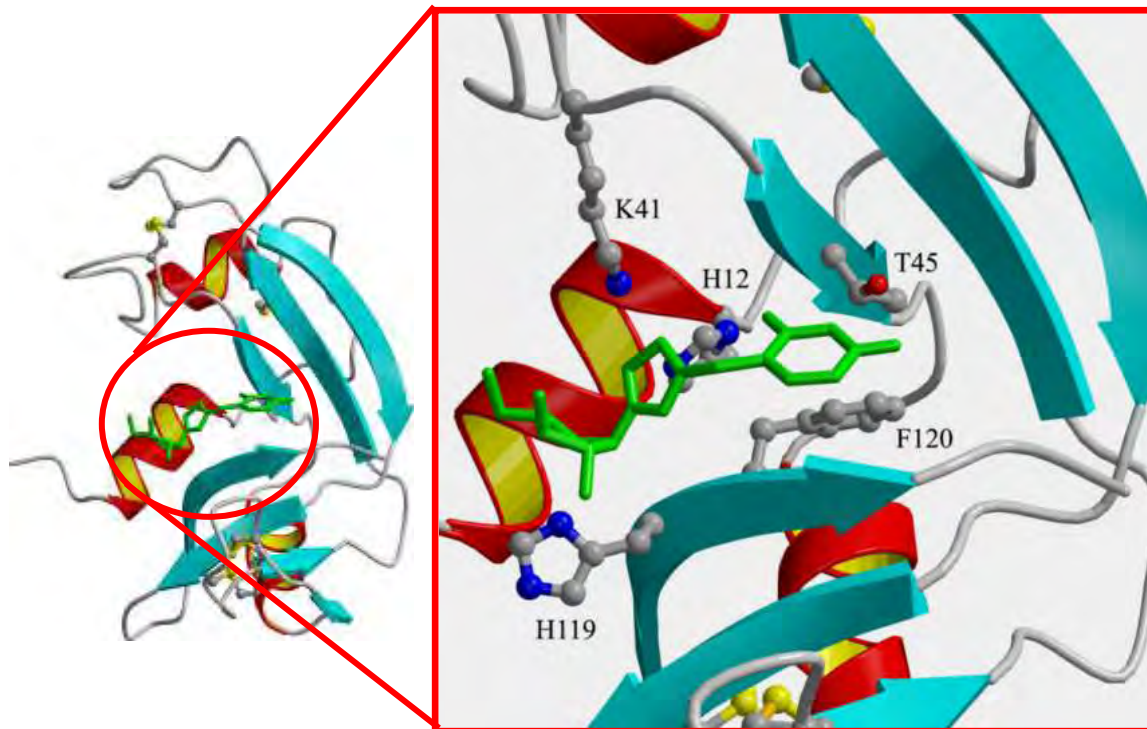
Στην ασύμμετρη μονάδα υπάρχουν δύο μόρια ριβονουκλεάσης A τα οποία είναι, σχεδόν κάθετα μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ τους συμβαίνει μέσω των αμινοξέων Gln60, Tyr76, Ser59, Asp53 και Ser77.

Από τα δεδομένα περίθλασης υπολογίστηκε ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας εκ διαφοράς Fourier. Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξε πρόσθετη πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο και ενός εκ των δύο μορίων της ριβονουκλεάσης στην ασύμμετρη μονάδα γεγονός που υποδηλώνει τη χωρίς αμφιβολία σύνδεση της 11VP001. Η δομή του αναστολέα προσαρμόστηκε στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα με μικρή μεταβολή των διέδρων γωνιών, με τη βοήθεια του προγράμματος COOT. Κατόπιν έγινε η βελτιστοποίηση του μοντέλου που προέκυψε μέσω του προγράμματος REFMAC.

Τα περισσότερα αμινοξέα της ριβονουκλεάσης είναι πολύ καλά καθορισμένα από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα με εξαίρεση την περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 16-22. Στις Εικόνες 24 και 25 παρουσιάζεται το τρισδιάστατο μοντέλο πρόσδεσης του αναλόγου νουκλεοσιδίου 11VP001 στο ενεργό κέντρο της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A.



Εικόνα 23 3-D μοντέλο πρόσδεσης του 11VP001 στο ενεργό κέντρο της RNase A. Ορατά τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου που αλληλεπιδρούν με το 11VP001



Εικόνα 24 3-D μοντέλο πρόσδεσης του 11VP001 στο ενεργό κέντρο της RNase A. Ορατά τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου που αλληλεπιδρούν με το 11VP001

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η RNase A έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα σχετίζεται με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Είναι το βασικό ένζυμο της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών και το μοτίβο του καταλυτικού της κέντρου διατηρείται στην πλειονότητα των ριβονουκλεασών, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα βάση για τη μελέτη όλων των ομόλογων πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε τρία ανάλογα νουκλεοζιτών πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση και μελετήσαμε την επίδρασή τους στη δραστηριότητα της RNase A. Μελέτες έχουν δείξει ότι κάποια συνθετικά ανάλογα νουκλεοζιτών έχουν αντικαρκινική και αντι-ϊική 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 στόχο νέων ουσιών με πιθανό κλινικό ενδιαφέρον. Στην εργασία μας επιλέχθηκε η μελέτη της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A για τους λόγους που προαναφέρθηκαν (βλ. Εισαγωγή).

Και οι τρεις χημικές ενώσεις που εξετάστηκαν παρουσίασαν μια σημαντική μείωση στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. 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 K_i σε χαμηλό εύρος μM . Δραστηκότερος αναστολέας της RNase A φαίνεται να είναι το 11VP001 με τιμή K_i 1,62 μM σε σχέση με τις άλλες δύο ουσίες 11VP006 και 11VP009 που παρουσιάζουν τιμές K_i 33,58 μM και 28,51 μM αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι μικρές αλλαγές στη δομή των μορίων μπορούν να παρουσιάσουν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις με το ένζυμο στόχο.

Βιβλιογραφία

Anfinsen C.B. et al. J Biol. Chem. 1954; 207: 201

Raines, R.T. Ribonuclease A. Chem. Rev. 1998;98:1045–1066.

Shapiro R. et al. Biochemistry 1986; 3527–3532

Agelis, G., N. Tzioumaki, et al. (2007). "Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine." *Bioorg Med Chem* **15**(16): 5448-5456.

Agelis, G., N. Tzioumaki, et al. (2008). "Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities." *Eur J Med Chem* **43**(7): 1366-1375.

Aravind, L. and E. V. Koonin (2001). "A natural classification of ribonucleases." *Methods Enzymol* **341**: 3-28.

Avey, H. P., M. O. Boles, et al. (1967). "Structure of ribonuclease." *Nature* **213**(5076): 557-562.

Blair, A., R. Saracci, et al. (1990). "Epidemiologic evidence on the relationship between formaldehyde exposure and cancer." *Scand J Work Environ Health* **16**(6): 381-393.

Bond, M. D. and B. L. Vallee (1990). "Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis." *Biochemistry* **29**(13): 3341-3349.

Chatani, E. and R. Hayashi (2001). "Functional and structural roles of constituent amino acid residues of bovine pancreatic ribonuclease A." *J Biosci Bioeng* **92**(2): 98-107.

Chatani, E., N. Tanimizu, et al. (2001). "Structural and functional changes in bovine pancreatic ribonuclease a by the replacement of Phe120 with other hydrophobic residues." *J Biochem* **129**(6): 917-922.

Curran, T. P., R. Shapiro, et al. (1993). "Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis." *Biochemistry* **32**(9): 2307-2313.

D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991). "Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily." *Trends Biochem Sci* **16**(3): 104-106.

Dostal, J. and J. Matousek (1973). "Isolation and some chemical properties of aspermatogenic substance from bull seminal vesicle fluid." *J Reprod Fertil* **33**(2): 263-274.

Fairman, R., K. R. Shoemaker, et al. (1990). "The Glu 2- ... Arg 10+ side-chain interaction in the C-peptide helix of ribonuclease A." *Biophys Chem* **37**(1-3): 107-119.

Fett, J. W., J. L. Bethune, et al. (1987). "Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane." *Biochem Biophys Res Commun* **146**(3): 1122-1131.

Hallahan, T. W., R. Shapiro, et al. (1992). "Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the angiogenic activity of human angiogenin." *Biochemistry* **31**(34): 8022-8029.

Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences* 2001

Kao, R. Y., J. L. Jenkins, et al. (2002). "A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 10066-10071.

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

Leland, P. A., L. W. Schultz, et al. (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10407-10412.

Leonidas, D. D., G. B. Chavali, et al. (2003). "High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors." *Protein Sci* **12**(11): 2559-2574.

Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., HO K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. *Biochemical pharmacology* 2010, p.79, 1772–1780. HOng B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I.,

Manta, S., G. Agelis, et al. (2008). "Unsaturated fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto-beta-d-glucopyranosyl derivatives of N(4)-benzoyl cytosine and N(6)-benzoyl adenine." *Eur J Med Chem* **43**(2): 420-428.

Moussaoui, M., M. V. Nogue, et al. (1998). "The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with cytidine 2',3'-cyclic phosphate." *J Biol Chem* **273**(40): 25565-25572.

Rosenberg, H. F. (2008). "RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story." *J Leukoc Biol* **83**(5): 1079-1087.

Rybak, S. M., D. S. Auld, et al. (1989). "C-terminal angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin." *Biochem Biophys Res Commun* **162**(1): 535-543.

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

Shapiro, R. and B. L. Vallee (1989). "Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis." *Biochemistry* **28**(18): 7401-7408.

Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. 1990. Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol* 214: 253-260.

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