



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

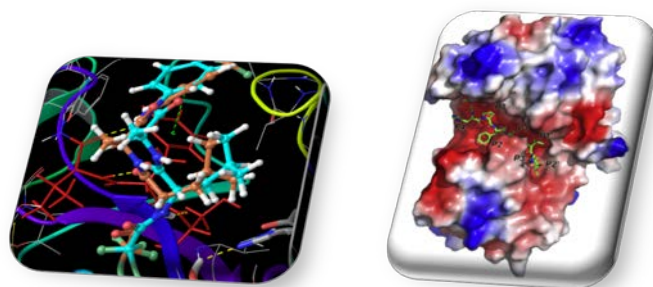
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ, ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**  
**ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΩΝ**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ**  
**ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc**



**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2017**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ, ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**  
**ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΩΝ**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ**  
**ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2017**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών  
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του  
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **816/ 27-05-2011**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: **Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ**

Μέλη:

**Χαράλαμπος Σταμάτης**

**Ευγενία Πάνου**

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **11-07-2011**

Θέμα: **«Αναλυτικές, κινητικές μέθοδοι και δομικές μελέτες για την διερεύνηση εξειδικευμένων βιοτεχνολογικών εφαρμογών πρωτεολυτικών ενζύμων σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή»**

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **951/20-06-2017**

1. **Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ**
2. **Χαράλαμπος Σταμάτης**
3. **Ευγενία Πάνου**
4. **Αθανάσιος Κουτίνας**
5. **Ιωάννης Ρούσης**
6. **Ευστάθιος Φριλίγγος**
7. **Άννα-Ειρήνη Κούκκου**

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό **«Άριστα / 10»** στις **23-6-2017**

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας  
Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος  
Ζωή-Βαλεντίνα Βαμβέτσου



## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

**Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ-Ομότιμος Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Χαράλαμπος Σταμάτης-Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ευγενία Πάνου-Αν. Καθηγήτρια**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Αθανάσιος Κουτίνας-Ομότιμος Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Ιωάννης Ρούσης-Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ευστάθιος Φριλίγγος-Καθηγητής**

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Άννα-Ειρήνη Κούκκου-Αν. Καθηγήτρια**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

**Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ-Ομότιμος Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Χαράλαμπος Σταμάτης-Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ευγενία Πάνου-Αν. Καθηγήτρια**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων







Ε. Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ ΙΙ), ΠΕΠ Μακεδονίας – Θράκης, ΠΕΠ Κρήτης και Νήσων Αιγαίου, ΠΕΠ Θεσσαλίας – Στερεάς Ελλάδας – Ηπείρου, ΠΕΠ Αττικής

Τμήμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο του έργου με τίτλο **«Νανο- και Μικρο-βιοτεχνολογία κυτταρίνης: Εφαρμογές σε Βιομηχανίες Τροφίμων» (11ΣΥΝ\_2\_1374)** των της πράξης «Συνεργασία 2011 - Συμπράξεις παραγωγικών και ερευνητικών φορέων σε εστιασμένους ερευνητικούς και τεχνολογικούς τομείς» στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ-ΙΙ), Άξονας Προτεραιότητας (Α.Π.) 1 «Δημιουργία και Αξιοποίηση της Καινοτομίας Υποστηριζόμενης από Έρευνα και Τεχνολογική Ανάπτυξη».



*Αφιερώνεται  
στη μνήμη της  
πολυαγαπημένης μου γιαγιάς  
Φωτεινής*



## Πρόλογος

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ.

Κατ'αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ για την αδιάκοπη συμπαράσταση, την άριστη καθοδήγηση του, τις πολύτιμες συμβουλές του και τα εφόδια που μου προσέφερε, τα οποία δεν είναι δυνατόν να απαριθμηθούν. Υπήρξε πάντα πρόθυμος όλα αυτά τα χρόνια, να ακούσει τους προβληματισμούς και τις απογοητεύσεις μου, μεταδίδοντας πάντα αισιοδοξία και προτείνοντας λύσεις. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή, την κατανόηση του στις δύσκολες στιγμές και για τις ευκαιρίες που μου πρόσφερε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Κουτίνα, ο οποίος συνέβαλλε ουσιαστικά στην ανάπτυξη του θέματος της παρούσας μελέτης, για τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του, καθώς και για την παρότρυνσή του για έρευνα.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στην Αν. Καθηγήτρια κ. Πολίτου Αναστασία για την φιλοξενία στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τη συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων Φθορισμομετρίας.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη και την Αν. Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου για τις σημαντικές παρεμβάσεις, τις συμβουλές και την στήριξη που μου προσέφεραν, καθώς και στα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους κ. Αθανάσιο Φούκη και κ. Όλγα Γκίνη, μέλη του Εργαστηρίου Ενζυμολογίας, για την αρμονική συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω και τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Ελευθερία Μπαρούνη για την άριστη συνεργασία και για την προσφορά των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για τη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια, τη συμπαράσταση και το φιλικό περιβάλλον συνεργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον συντροφό μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στηριξή του, αλλά κυρίως για την ενθάρρυνση και την αισιοδοξία του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και το Νίκο για την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή τους, καθώς και για τις θυσίες που έκαναν για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την παρούσα διατριβή. Ήταν πάντα εκεί όταν το χρειαζόμουν...



## Περίληψη

---

Οι πρωτεάσες έχουν ευρεία εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως η βιοτεχνολογία, η παραγωγή τροφίμων, οι ζωοτροφές, τα φάρμακα και τα καλλυντικά κ.α., αποτελώντας σημαντικά εργαλεία έρευνας με σκοπό την ανάπτυξη. Έτσι, η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης τους και η συσχέτιση της με την δομή τους, δηλαδή οι τρόποι αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια των υποκαταστατών τους (υποστρώματα, αναστολείς, κ.λ.π.), εκτός από το ερευνητικό τους ενδιαφέρον, είναι προαπαιτούμενα για την χρήση των ενζύμων αυτών σε εξειδικευμένες βιοτεχνολογικές και άλλες εφαρμογές. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικές, κινητικές και δομικές/υπολογιστικές μεθοδολογίες για την διερεύνηση εξειδικευμένων βιοτεχνολογικών εφαρμογών δύο πρωτεολυτικών ενζύμων, της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PPE) και της ρεννίνης από τον μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus* (MPR).

Διερευνήθηκε για πρώτη φορά ο μηχανισμός της αντιστρεπτής αναστολής της PPE από Τριφθορο-ακετυλ-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια, που εκτός του πιθανό μελλοντικό σχεδιασμό παραγώγων κατά της παθογένεσης του εμφυσήματος, συντέινει αποφασιστικά στην διερεύνηση αλληλεπιδράσεων τύπου ενζύμου-υποστρώματος και από αυτές στον σχεδιασμό και την σύνθεση σημαντικών υποστρωμάτων άλλων πρωτεασών, χρήσιμων σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Αναλύθηκε διεξοδικά, με εφαρμογή κινητικών μεθοδολογιών, η υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την PPE παρουσία και απουσία αντιστρεπτών ενζυμικών αναστολέων του τύπου CF<sub>3</sub>C(O)-XA-NHPH-p-CF<sub>3</sub> (όπου X={K,V,D}) και πραγματοποιήθηκαν, επίσης, υπολογιστικές προσομοιώσεις για μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ PPE και των αντιστρεπτών αυτών αναστολέων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ η υδρόλυση του Suc-AAA-pNA από την PPE, απουσία αντιστρεπτών αναστολέων, προχωρά μέσω μίας εικονικής μεταβατικής κατάστασης που περιλαμβάνει ένα ελάχιστον φυσικό κι ένα κυρίαρχο χημικό στάδιο με δύο σταθεροποιημένες καταστάσεις αντιδρώντων να προηγούνται του κυρίαρχου ακυλο-ενζύμου, ωστόσο η ίδια υδρολυτική αντίδραση, παρουσία των αντιστρεπτών αναστολέων, αποδείχθηκε ότι προχωρά με απουσία εικονικής μεταβατικής κατάστασης, υποδεικνύοντας έτσι έναν διαφορετικό τρόπο κατάλυσης, η οποία πραγματοποιείται μέσω ενός τροποποιημένου δομικά ενζυμικού μορίου. Ως τελικό συμπέρασμα προτείνεται ένας νέος και λεπτομερής μηχανισμός αντιστρεπτής αναστολής της PPE.

Η MPR είναι ένα πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο της βοοειδούς χυμοσίνης, με αυξανόμενη χρήση, παγκοσμίως. Έτσι, η ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR, σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή και η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της αποτελούν πρόκληση για την ευρεία χρήση της στην βιομηχανική παραγωγή τυριού.



Η απουσία ευαίσθητου και αναλυτικά αξιόπιστου υποστρώματος για ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικότητας της MPR αποτελούσε πρόβλημα.

Τα υπάρχοντα υποστρώματα δεν προσέφεραν αξιόπιστους ποσοτικούς προσδιορισμούς της δραστικότητας της MPR, ούτε δυνατότητα διερεύνησης του μηχανισμού δράσης της, λόγω σφαλμάτων των εμμέσων, μη αυτοματοποιημένων μετρήσεων, που αυτά επέτρεπαν.

Έτσι επιλέχθηκε ο σχεδιασμός φθορισμομετρικών πεπτιδικών υποστρωμάτων, όπου κατά την υδρόλυσή τους λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster (FRET-πεπτιδία). Με χρήση υπολογιστικών τεχνικών προσομοίωσης προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις κατά την πρόσδεση μιας σειράς πιθανών FRET-πεπτιδικών υποστρωμάτων στην ενεργό περιοχή της MPR και εξετάστηκε η σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδίων. Από αυτά επιλέχθηκαν υποστρώματα που δίδεταν τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά και ακολούθησε σταδιακή σύνθεση των FRET-πεπτιδικών υποστρωμάτων σε υγρή φάση (Fmoc/Butyl) με την μεθοδολογία των μεικτών ανυδριτών. Από τα φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αντίδραση της υδρόλυσης τεσσάρων συντεθέντων FRET-πεπτιδίων από την MPR, προέκυψε ότι μόνο τρία από αυτά, τα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, παρουσίασαν φθορισμό με μέγιστο  $\lambda_{em} = 415$  nm και επομένως συνιστούν υποστρώματα της MPR. Οι κινητικές μελέτες με τα τρία προαναφερθέντα FRET-πεπτιδικά υποστρώματα έδειξαν ότι το Abz-GFY-pNA διαθέτει τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά δηλαδή υψηλή εξειδίκευση κι ευαισθησία. Έτσι, αναπτύχθηκε μια νέα αυτοματοποιημένη και στατιστικά ισχυρή μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, βασισμένη στην μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA, αλλά και προτάθηκε ένας νέος μηχανισμός, που διαφωτίζει αρκετά σημεία-κλειδιά της δράσης της MPR και που ενδεχομένως να μπορεί να αντιστοιχηθεί και σε άλλες ασπαρτικοπρωτεΐνάσες.

**Λέξεις-κλειδιά:** PPE, Τριφθορο-ακετυλ-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια, αντιστρεπτή αναστολή, MPR, FRET-πεπτιδικά υποστρώματα, ενζυμική δραστικότητα

## Abstract

---

Proteases found a wide application in various areas, such as biotechnology, food production, animal feed, pharmaceuticals and cosmetics, etc., being important research tools for development. Thus, the elucidation of their mechanism of action and its correlation with their structure, i.e. the ways of interacting with their ligand molecules (substrates, inhibitors, etc.), apart from a research interest, are prerequisites in using these enzymes in specific biotechnological and other applications. In this dissertation analytical, kinetic and structural/computational methodologies were employed targeting on the investigation of specialized biotechnological applications of two proteases, the porcine pancreatic elastase (PPE), and the rennin from *Rhizomucor pusillus* (MPR).

The mechanism of reversible inhibition of PPE was investigated for first time using Trifluor-acetyl-dipeptidyl-p-trifluor-anilides, where in addition to the potential design of remedy derivatives counter to the pathogenesis of emphysema, they have decisively contributed to the investigation of enzyme-substrate interactions and the design and synthesis of important substrates of other proteases useful in biotechnological applications. The hydrolysis of substrate Suc-AAA-pNA by the PPE has been thoroughly analyzed using kinetic methodologies in presence and absence of reversible inhibitors of the general type  $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-XA-NHPh-p-CF}_3$  (where  $X=\{\text{K,V,D}\}$ ), and additionally computer simulations were performed to study the PPE/reversible inhibitors' interactions. The results showed that although the hydrolysis of Suc-AAA-pNA by PPE in the absence of reversible inhibitors proceeds via a virtual transition state comprising a minor physical step and a major chemical step, where two stabilized reactant states precede the dominant acyl-enzyme, however the same hydrolytic reaction, in presence of the reversible inhibitors, proceeds without the formation of a virtual transition state, thus showing a different type of catalysis, which is performed through a structurally modified PPE-molecule. Finally, a novel detailed mechanism of the reversible inhibition of PPE is suggested.

MPR is a well promising substitute of bovine chymosin, with a worldwide increasing use. Therefore, the development of an automatic and sensitive method of quantitative determination of the MPR activity, in free as well as in immobilized form, along with the elucidation of its mechanism of action are a challenge for a widespread use of MPR in industrial cheese production. The absence of an analytically robust substrate, to be used for the quantitative determination of the MPR activity was a problem. The already existing substrates did provide neither reliable quantitative determinations of the MPR activity, nor the possibility of investigating its mechanism of action, due to errors of indirect, non-automated measurements that allowed.

Consequently, the design of fluorimetric peptide substrates was chosen, where during their hydrolysis a Fluorescence Resonance Energy Transfer

occurs due to a Förster resonance (FRET-peptides). By employing computational simulation techniques, the binding interactions of a series of potential FRET-substrates onto the active site of MPR were determined, and the stability of the formed MPR/FRET-peptide complexes was examined. In this way, they were chosen these substrates with the requisite characteristics; it was followed the stepwise synthesis of the FRET-substrates in liquid phase (Fmoc/Butyl) by means of the mixed anhydride method.

By based on the fluorescence emission spectra (max.  $\lambda_{em} = 415$  nm) recorded during the hydrolysis reactions of four synthesized FRET-substrates by MPR, it was shown that only three of them, the Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA and Abz-GFI-pNA should be further considered. The kinetic studies, by the use of the abovementioned FRET-substrates showed that the Abz-GFY-pNA possesses the required characteristics, i.e. high specificity and sensitivity. Therefore, a novel automated and statistically robust method has been developed for the quantitative determination of the MPR activity, in free as well as in immobilized form, by based on the fluorescence intensity variation ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) during the hydrolysis of Abz-GFY-pNA; likewise, a new mechanism of action was proposed, which highlights some key-features of the catalytic action of MPR, which could be also assigned to other aspartic proteases.

**Keywords:** PPE, Trifluor-acetyl-dipeptidyl-p-trifluor-anilides, reversible inhibition, MPP, FRET-substrates, enzyme activity

## Σκοπός της διατριβής

---

Ο γενικός σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η διερεύνηση τρόπων παραγωγικής αξιοποίησης δύο πολυсуζητημένων (στην διεθνή βιβλιογραφία) πρωτεολυτικών ενζύμων, της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PPE) και της ρεννίνης από τον μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus* (MPR), για χρήση σε εξειδικευμένες βιοτεχνολογικές και άλλες εφαρμογές.

Από αυτόν τον γενικό σκοπό προέκυψαν δύο αντίστοιχοι επιμέρους σκοποί:

(α) Η διερεύνηση του μηχανισμού της αντιστρεπτής αναστολής της PPE από Τριφθορο-ακετυλ-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια, ως χρήσιμου εργαλείου για μελλοντικό σχεδιασμό παραγωγών κατά της παθογένεσης του εμφυσήματος, αλλά και σημαντικά αποφασιστικό βήμα για την αξιόπιστη διερεύνηση αλληλεπιδράσεων τύπου ενζύμου-υποστρώματος, προς σχεδιασμό και σύνθεση σπουδαίων υποστρωμάτων πρωτεασών, χρήσιμων στην βιομηχανία και την βιοτεχνολογία.

(β) Η ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR, σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, διαμέσου στοχευμένου και συστηματικού σχεδιασμού και σύνθεσης εξειδικευμένων υποστρωμάτων της, αλλά και η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της για ευρεία χρήση της στην βιομηχανική παραγωγή τυριού.

Τόσο ο γενικός σκοπός, όσο και οι δύο επιμέρους σκοποί, επιτεύχθηκαν με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.



## Συντμήσεις και συμβολισμοί

---

Οι συντμήσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα Διατριβή έχουν προταθεί από την Επιτροπή Βιοχημικής Ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) και της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας (IUD).

**A:** Αλανίνη  
**Abz:** Αμινο-βενζοϊκό οξύ  
**BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O:** Διαιθυλ-αιθέρας τριφθοριούχου βορίου  
**Boc-:** Τριτοταγής Βουτυλοξυ-καρβονυλ-ομάδα  
**C:** Κυστεΐνη  
**CH<sub>3</sub>COOH:** Οξικό οξύ  
**D:** Ασπαρτικό οξύ  
**DMF:** Διμέθυλοφορμαμίδιο  
**DMSO:** Διμέθυλο σουλφοξείδιο  
**E:** Γλουταμινικό οξύ  
**E-acyl :** Ακυλιωμένο ένζυμο  
**ES:** Σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος  
**F:** Φαινυλαλανίνη  
**Fmoc:** 9-φλουρενυλομεθοξυ-καρβονυλ-ομάδα  
**FRET:** Förster Resonance Energy Transfer  
**G:** Γλυκίνη  
**GBK:** Εξίσωση Gross-Butler-Kresge  
**H:** L-Ιστιδίνη  
**HBr/AcOH:** Υδροβρώμιο/Οξικό οξύ  
**HBr/HCl:** Υδροβρώμιο/ Υδροχλώριο  
**HF:** Υδροφθόριο  
**I:** Ισολευκίνη  
**ImH<sup>+</sup>:** Πρωτονιομένο Ιμιδαζόλιο L-Ιστιδίνης  
**I.U.:** Διεθνής μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας  
**K:** Λυσίνη  
**kDa:** kilodaltons  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Όξινο φωσφορικό κάλιο  
**MPR:** Ρεννίνη από τον μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus*  
**N:** Ασπαραγίνη  
**Na/NH<sub>3</sub>:** Νάτριο/ Αμμωνία  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Όξινο φωσφορικό νάτριο  
**NaCl:** Χλωριούχο νάτριο  
**NaOH:** Υδροξείδιο του νατρίου  
**ns:** nanosecond  
**Pd/H<sub>2</sub>:** Παλλάδιο/ Υδρογόνο  
**pNA:** π-νιτροανιλίνη  
**PPE :** Παγκρεατική ελασάση χοίρου  
**ps:** picosecond  
**Q:** Γλουταμίνη  
**R:** Αργινίνη  
**S:** Σερίνη  
**Suc-:** Ηλεκτρολυομάδα {HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-}

**T:** Θρεονίνη  
**tBu:** Τριτοταγής βουτυλομάδα  
**TFA:** Τριφθοροξικό οξύ  
**TIS:** Τρισοπτοπυλοσιλάνιο  
**Tris-HCl:** Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο υδροχλώριο  
**V:** Βαλίνη  
**W:** Θρυπτοφάνη  
**Y:** Τυροσίνη  
**I.Φ.Δ.:** Ισοτοπικό Φαινόμενο Διαλύτη  
**φ:** Ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης

# Περιεχόμενα

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Πρωτεολυτικά Ένζυμα.....	1
1.1 Σερινοπρωτεΐνάσες .....	3
1.1.1 Εισαγωγή .....	3
1.1.2 Μηχανισμός δράσης των Σερινοπρωτεΐνασών .....	4
1.1.3 Οικογένεια Χυμοθρυψίνης (της υποομάδας των σερινοπρωτεΐνασών) .....	8
1.1.4 Η Ελαστάση ως εισαγωγή στην Ενζυμική Κινητική και στις υπολογιστικές μεθόδους.....	9
1.2 Ασπαρτικοπρωτεΐνάσες.....	12
1.2.1 Εισαγωγή .....	12
1.2.2 Μηχανισμός δράσης των ασπαρτικοπρωτεΐνασών .....	14
1.2.3 Ασπαρτικοπρωτεΐνάσες στην παραγωγή τυριού και δράση του ενζύμου ρεννίνη επί της πήξης του γάλακτος.....	22
1.2.4 Πρωτεάσες από <i>Mucor sp</i> ως εναλλακτική πηγή ρεννίνης.....	25
1.3 Αλληλεπιδράσεις Πρωτεϊνών-Υποκαταστατών .....	29
1.3.1 Υπολογιστική Προσομοίωση Μοριακής Πρόσδεσης (molecular docking) .....	29
1.3.1.α Μεθοδολογία υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης .....	31
1.3.1.β Αλγόριθμοι αναζήτησης .....	32
1.3.1.γ Συναρτήσεις επιτυχίας-αξιολόγησης.....	34
1.3.1.δ Το πρόγραμμα υπολογιστικών προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης Glide.....	35
1.3.2 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής .....	37
1.3.2.α Εισαγωγή και Βασικές αρχές της κλασικής μοριακής δυναμικής .....	37
1.3.2.β Διαδικασία μιας προσομοίωσης .....	39
1.3.3 Συνδυαστική χρήση τεχνικών υπολογιστικής προσομοίωσης πρόσδεσης και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής .....	41
1.4 Πεπτιδική σύνθεση .....	42
1.4.1 Εισαγωγή .....	42
1.4.2 Προστατευτικές ομάδες .....	44
1.4.2.α Προστασία της $\alpha$ -Αμινομάδας των Αμινοξέων .....	45
1.4.2.β Προστασία $\alpha$ -Καρβοξυλομάδας .....	47
1.4.2.γ Προστασία πλευρικών (δραστικών) ομάδων αμινοξέων .....	48
1.4.3 Ορθογωνικότητα.....	51
1.4.4 Μέθοδοι σύζευξης (Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού) .....	51
1.4.4.α Μέθοδος των Καρβοδιιμιδίων .....	52



1.4.4.β Μέθοδος των Ανυδριτών .....	53
1.4.4.γ Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων .....	55
1.4.4.δ Μέθοδος των Αζιδίων .....	56
1.4.4.ε Μέθοδος φωσφονικών και ουρονικών παραγώγων.....	56
1.4.5 Ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά την πεπτιδική σύνθεση .....	58
1.4.5.α Ρακεμίωση.....	58
1.4.5.β Σχηματισμός Δικετοπιπεραζινών .....	60
1.4.6 Στρατηγικές της πεπτιδικής σύνθεσης .....	60
1.4.7 Τεχνικές της πεπτιδικής σύνθεσης.....	61
1.4.7.α Πεπτιδική Σύνθεση σε Υγρή Φάση .....	61
1.4.7.β Πεπτιδική Σύνθεση σε Στερεή Φάση .....	62
1.5.Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων .....	63
1.5.1 Εισαγωγή .....	63
1.5.2 Εξίσωση Michaelis - Menten .....	63
1.5.3 Η σημασία των παραμέτρων Michaelis-Menten .....	66
1.5.3.α Η έννοια της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ . Η σταθερά εξειδίκευσης .....	66
1.5.3.β Η έννοια της $K_m$ . Πραγματικές και φαινόμενες σταθερές ισορροπίας ...	67
1.5.3.γ Η έννοια της $k_{cat}$ . Η καταλυτική σταθερά.....	68
1.5.4 Εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ από την τιμή της (απόλυτης) θερμοκρασίας και την τιμή pH .....	69
1.5.4.α Εξάρτηση από την (απόλυτη) θερμοκρασία των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ (εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius) .....	69
1.5.4.β Εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ από την τιμή pH .....	73
1.6 Μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων.....	77
1.6.1 Εισαγωγή .....	77
1.6.2 Μίγματα $D_2O/H_2O$ .....	79
1.6.3 Ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης .....	80

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2Α. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΧΟΙΡΟΥ (PPE).....	83
2Α.1 Υλικά.....	83
2Α.1.1 Ένζυμα .....	83
2Α.1.2 Χημικά αντιδραστήρια και λοιπά .....	83
2Α.1.3 Υπολογιστικά Προγράμματα.....	83

2A.2 Καμπύλη Michaelis-Menten της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου σε $\theta = 25^{\circ}\text{C}$ και τιμή $\text{pH} = 8.00$ .....	83
2A.3 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_m$ , $k_{\text{cat}}$ και $1/K_m$ της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου ως συνάρτηση της τιμής $\text{pH}$ του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $\text{pK}_a$ .....	84
2A.4 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_m$ , $k_{\text{cat}}$ και $K_m$ της PPE ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης .....	86
2A.5 Πειραματική πορεία της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτωνίων .....	87
2A.5.1 Εισαγωγή.....	87
2A.5.2 Προσδιορισμός της παραμέτρου $k_{\text{cat}}/K_m$ σε διάφορα μίγματα $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ .....	92
2A.6 Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων της PPE με αντιστρεπτούς αναστολείς.....	93
2A.6.1 Μελέτες υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων στην ενεργό περιοχή της PPE .....	93
2A.6.2 Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης .....	94
2A.6.3 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής του συμπλόκου PPE-τριφθοροακετυλοπεπτιδικών ανιλιδίων .....	94
2A.7 Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας του συμπλόκου PPE-αναστολέα ( $K_i$ ) για τη σειρά των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών π-τριφθορο-ανιλιδίων .....	95
2A.8 Εξάρτηση της αναστολής από την τιμή $\text{pH}$ του μέσου της αντίδρασης: μέτρηση της μεταβολής της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα $K_f (= 1/K_i)$ .....	96
2A.9 Μέτρηση της μεταβολής της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα $K_f (= 1/K_i)$ σε διάφορα μίγματα $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ .....	97
2B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ RENNINΗ MPR.....	99
2B.1 Υλικά.....	99
2B.1.1 Ένζυμα .....	99
2B.1.2 Χημικά αντιδραστήρια, αμινοξέα και λοιπά .....	99
2B.1.3 Υπολογιστικά Προγράμματα .....	99
2B.2 Χρήση υπολογιστικών τεχνικών για το σχεδιασμό υποψήφιων υποστρωμάτων και την μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους με την MPR .....	99
2B.2.1 Μελέτη των υποπεριοχών πρόσδεσης υποστρώματος της MPR.....	100
2B.2.2 Μελέτες Προσομοιώσεων Μοριακής Πρόσδεσης των FRET-πεπτιδίων στην MPR.....	103
2B.2.3 Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης για το κάθε σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος .....	105
2B.2.4 Μελέτες Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των συμπλόκων MPR-υποστρωμάτων .....	105
2B.2.5 Προσομοιώσεις Μεταδυναμικής των καλύτερων συμπλόκων MPR-FRET πεπτιδίων .....	106

2B.3 Πεπτιδική Σύνθεση των φθορισμομετρικών παραγώγων (FRET πεπτιδίων) ..	108
2B.3.1 Εισαγωγή .....	108
2B.3.2 Σύνθεση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA(FS1) .....	111
2B.3.3 Στάδια σύνθεσης των υποστρωμάτων FS2 και FS3 .....	115
2B.3.4 Σύνθεση του υποστρώματος Abz-GFI-pNA(FS4) .....	125
2B.4 Φθορισμομετρικά παράγωγα ως υποστρώματα της MPR .....	128
2B.4.1 Εισαγωγή-Αρχή της μεθόδου .....	128
2B.4.2 Έλεγχος υδρόλυσης των FRET παραγώγων από την MPR .....	130
2B.5 Προσδιορισμός των παραμέτρων Michaelis-Menten της MPR με τα νεοσυντιθέμενα φθορισμομετρικά υποστρώματα σε $\theta = 35^{\circ}\text{C}$ και τιμή $\text{pH} = 3.70$ ...	131
2B.6 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ , $k_{\text{cat}}$ και $1/K_{\text{m}}$ της MPR, ως συνάρτηση της τιμής $\text{pH}$ του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $\text{pK}_{\text{a}}$ .....	132
2B.7 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ και $k_{\text{cat}}$ της MPR ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της ενζυμικής υδρόλυσης .....	133
2B.8 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ και $k_{\text{cat}}$ της MPR σε διάφορα μίγματα $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ .....	134
2B.9 Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή .....	134
2B.9.1 Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή .....	134
2B.9.2.α Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή .....	135
2B.9.2.β Έλεγχος λειτουργικής σταθερότητας των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις: συσχέτιση της προσδιοριζόμενης δραστηριότητας της MPR και της ικανότητας πήξης γάλακτος .....	138

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3Α. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΧΟΙΡΟΥ (PPE) .....	140
3Α.1 Κινητική της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου .....	140
3Α.2 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ , $k_{\text{cat}}$ και $1/K_{\text{m}}$ της PPE, ως συνάρτηση της τιμής $\text{pH}$ του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $\text{pK}_{\text{a}}$ .....	140
3Α.3 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ , $k_{\text{cat}}$ και $K_{\text{m}}$ της PPE ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της αντίδρασης .....	142
3Α.4 Η εξάρτηση της παραμέτρου $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ της PPE ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης .....	148
3Α.5 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PPE και των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων (ανταγωνιστικών αναστολέων) .....	150

3A.6 Έλεγχος σταθερότητας και προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων εντός του συμπλόκου PPE-αναστολέα-1 .....	153
3A.7 Κινητική της αναστολής της PPE με τα τριφθοροακετυλοπεπτιδικά ανιλίδια ...	156
3A.7.1 Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας των συμπλόκων PPE-αναστολέων ( $K_i$ ) .....	156
3A.7.2 Εξάρτηση της αναστολής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης: μεταβολή της σταθεράς σχηματισμού του κάθε συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα $K_i$ ( $=1/K_i$ ) .....	158
3A.7.3 Η εξάρτηση της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα $K_i$ ( $=1/K_i$ ) ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης.....	160
<b>3B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ MPR .....</b>	<b>165</b>
3B.1 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων και αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης των FRET-πεπτιδικών παραγώγων στην MPR .....	165
3B.2 Προσδιορισμός του είδους και της διάρκειας των αλληλεπιδράσεων (σταθερότητα) των συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων.....	169
3B.3 Επανεξέταση της σταθερότητας των συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων .....	176
3B.4 FRET-παραγωγή ως υποστρώματα της MPR.....	181
3B.5 Κινητική της MPR με τα νεοσυντεθέντα FRET-πεπτιδικά υποστρώματα .....	183
3B.6 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $1/K_m$ της MPR, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $pK_a$ .....	186
3B.7 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της MPR ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της αντίδρασης .....	190
3B.8 Η εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της MPR ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης.....	201
3B.9 Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή.....	205
3B.9.1 Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή .....	205
3B.9.2.α Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή .....	206
3B.9.2.β Συσχέτιση της προσδιοριζόμενης δραστηριότητας της ακινητοποιημένης MPR και της ικανότητας πήξης γάλακτος.....	208

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

4.A ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΧΟΙΡΟΥ (PPE) ΑΠΟ ΤΡΑ-ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΚΑ-Π-ΤΡΙΦΘΟΡΟ-ΑΝΙΛΙΔΙΑ.....	211
---	-----

4.B PENNINΗ (MPR) ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ <i>RHIZOMUCOR PUSILLUS</i> : 217	
(i) Σχεδιασμός και σύνθεση νέων πεπτιδικών υποστρωμάτων για την μέτρηση της δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη κι ακινητοποιημένη μορφή	
(ii) Αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης και εύρεση του πιθανού μηχανισμού δράσης της MPR επί του υποστρώματος Abz-GFY-pNA.....	217

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>228</b>
--------------------------------------	------------

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>244</b>
------------------------	------------

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

<b>Εικόνα 1.1:</b> Ένζυμα-εκπρόσωποι των σερινοπρωτεϊνών της οικογένειας της χυμοθρυψίνης. ....	8
<b>Εικόνα 1.2:</b> Σχηματική απεικόνιση ενεργών περιοχών θρυψίνης, χυμοθρυψίνης και ελαστάσης.....	9
<b>Εικόνα 1.3:</b> Τρισδιάστατη δομή της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PDBID:7EST). ....	10
<b>Εικόνα 1.4:</b> Αμινοξική αλληλουχία της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται τα καταλυτικά κατάλοιπα). ....	10
<b>Εικόνα 1.5:</b> Τρισδιάστατη δομή μιας τυπικής ασπαρτικοπρωτεϊνάσης (Accession number: 1j71): <b>A</b> ) Αναπαράσταση των κύριων δομικών στοιχείων, όπου διακρίνονται η ενεργός περιοχή (με κόκκινο), οι δισουλφιδικοί δεσμοί (με κίτρινο) και το κάλυμα με δομή β-φουρκέτας (πράσινο χρώμα), <b>B</b> ) Σχισμή ενεργού περιοχής και καταλυτικά κατάλοιπα. ....	14
<b>Εικόνα 1.6:</b> Μια άποψη της σχισμής πρόσδεσης του υποστρώματος των ασπαρτικοπρωτεασών (PDB ID:1OEX <sup>44</sup> ) .....	15
<b>Εικόνα 1.7:</b> Στερεοσκοπικές απεικονήσεις: <b>(A)</b> δομή του αναστολέα Isovaleryl-valyl-valyl-difluorostatone methylester δεσμευμένου στο καταλυτικό κέντρο της πενικιλοπεψίνης και <b>(B)</b> υπέρεθεση αυτής της δομής και του OMTKY3 προσδεδμένου στο καταλυτικό κέντρο της α-χυμοθρυψίνης .....	17
<b>Εικόνα 1.8:</b> Αναπαράσταση καζεϊνικού μικκυλίου .....	23
<b>Εικόνα 1.9:</b> Στάδια ενζυμικής πήξης γάλακτος όπου α) υδρόλυση της κ-καζεΐνης στη θέση F <sup>105</sup> -M <sup>106</sup> και β) συσσωμάτωση των μικκυλίων καζεΐνης.....	24
<b>Εικόνα 1.10:</b> Υπέρεθεση της δομής της MPR με αυτή της χυμοσίνης με τον αναστολέα CP-113972, για τον προσδιορισμό των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος. 27	
<b>Εικόνα 1.11:</b> Αναπαράσταση της σύνδεσης της μακροσκοπικής συμπεριφοράς ενός συστήματος μέσω των αλληλεπιδράσεων σε μικροσκοπικό επίπεδο (προσομοίωση μοριακής δυναμικής). ....	38
<b>Εικόνα 2.1.</b> Φάσματα απορρόφησης (κόκκινο) και φάσματα εκπομπής (μπλε) ζεύγους φθορισμοφόρων δότη-δέκτη. Η γκρι περιοχή δηλώνει την επικάλυψη του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη .....	129

**Εικόνα 3.1:** Στιγμιότυπα του τρόπου πρόσδεσης των αναστολέων 1-4 στην ενεργό περιοχή της PPE (7EST) όπως προέκυψαν από την μέθοδο μεγάλης ακρίβειας πρόσδεσης (Glide XP) όπου φαίνονται: (α) Αλληλεπικάλυση της προσδεδμεμένης (docked) πόζας (γαλάζιο χρώμα) του αναστολέα-2 με την διαμόρφωση της κρυσταλλικής του δομής (καφέ), (β) αναστολέας-1, (γ) αναστολέας-3, (δ) αναστολέας-4 (κατάταξη στον Πίνακα 3.1). .....152

**Εικόνα 3.2:** (α) Οι τιμές RMSD και των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού της PPE, αλλά και των βαρέων ατόμων του αναστολέα  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ . Η RMSD εξέλιξη της PPE βασίστηκε στα  $\alpha$ -άτομα άνθρακα (αριστερός Y-άξονας), ενώ η τιμή RMSD του αναστολέα βασίστηκε σε όλα τα βαρέα του άτομα (δεξιός Y-άξονας), κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD), (β) Η γραφική παράσταση των διακυμάνσεων της μέσης τετραγωνικής ρίζας των ομάδων του  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$  με αναφορά την PPE .....154

**Εικόνα 3.3:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ PPE και αναστολέα  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$  κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD): (α) τύποι και % ποσοστά αλληλεπιδράσεων της PPE με σημαντικά κατάλοιπων του αναστολέα, (β) λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις PPE-αναστολέα που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης (η ομάδα  $-C_6H_4-CF_3$  του καρβόξυ-τελικού άκρου του αναστολέα  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$  βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων  $F^{215}$  και  $R^{217}$  του πρωτεϊνικού σκελετού της PPE). .....155

**Εικόνα 3.4:** Υπολογιστικά αποτελέσματα της πρόσδεσης των παραγώγων (α) Abz-GFY-pNA και (β) Abz-SFY-pNA στην ενεργό περιοχή της MPR .....167

**Εικόνα 3.5:** Οι τιμές RMSD και των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού της MPR, αλλά και των βαρέων ατόμων των FRET-πεπτιδικών παραγώγων (α) Abz-GFY-pNA, (β) Abz-SFY-pNA, (γ) Abz-GFI-pNA και (δ) Abz-GNSFY-pNA. Η RMSD εξέλιξη της MPR βασίστηκε στα  $\alpha$ -άτομα άνθρακα (αριστερός Y-άξονας), ενώ η τιμή RMSD των FRET-πεπτιδικών παραγώγων βασίστηκε σε όλα τα βαρέα του άτομα (δεξιός Y-άξονας), κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD). .....170

**Εικόνα 3.6:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος Abz-GFY-pNA κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης .....171

**Εικόνα 3.7:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA** κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης .....172

**Εικόνα 3.8:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος Abz-GFI-pNA κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης .....173

**Εικόνα 3.9:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος Abz-GNSFY-pNA κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης .....175

**Εικόνα 3.10:** Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** όπου φαίνεται ότι τόσο η απόσταση μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του οξυγόνου του καταλυτικού μορίου  $H_2O$  (**CV1**, ~3.6 Å και ~3.8 Å), αλλά και απόσταση μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του υδρογόνου του **H-N<** του σκελετού της **G<sup>76</sup>** (**CV2**, ~1.7 Å και ~2.5 Å) σταθεροποιούνται με πολύ χαμηλή

ενέργεια ενεργοποίησης (< 0.4 kcal/mol). .....	177
<b>Εικόνα 3.11:</b> Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος <b>Abz-SFY-pNA</b> : οι αποστάσεις <b>CV1</b> , (~3.4 Å) και <b>CV2</b> (~1.8 Å), σταθεροποιούνται με σχετικά υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης (0.4 < E.E. < 0.7 kcal/mol). .....	178
<b>Εικόνα 3.12:</b> Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος <b>Abz-GFI-pNA</b> : οι αποστάσεις <b>CV1</b> , (~3.4 Å) και <b>CV2</b> (~1.7 Å), σταθεροποιούνται με σχετικά υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης (0.4 < E.E. < 0.8 kcal/mol). .....	179
<b>Εικόνα 3.13:</b> Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος <b>Abz-GNSFY-pNA</b> : οι αποστάσεις <b>CV1</b> , (~3.8 Å) και <b>CV2</b> (~4.8 Å) αν και είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τα προηγούμενα FRET-υποστρώματα, ωστόσο σταθεροποιούνται σε πολύ χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης (< 0.4 kcal/mol), κατά πάσα πιθανότητα λόγω της μεγαλύτερης πεπτιδικής αλληλουχίας.....	180

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1:</b> Ασπαρτικοπρωτεΐνάσες μικροβιακής προέλευσης με ικανότητα πήξης γάλακτος .....	25
<b>Πίνακας 1.2:</b> Φυσικά υποστρώματα της ρεννίνης από το <i>Mucor pusillus</i> .....	28
<b>Πίνακας 1.3:</b> α-Αμινο προστατευτικές ομάδες και οι συνθήκες απομάκρυνσής τους	46
<b>Πίνακας 1.4:</b> Οι σημαντικότερες μονομερείς καρβοξυπροστατευτικές ομάδες .....	47
<b>Πίνακας 1.5A:</b> Προστασία πλευρικών ομάδων αμινοξέων (Boc/Bzl μεθοδολογία) ..	49
<b>Πίνακας 1.5B:</b> Προστασία πλευρικών ομάδων αμινοξέων (Fmoc/tButyl μεθοδολογία) .....	50
<b>Πίνακας 1.6:</b> Ενεργοί εστέρες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση .....	55
<b>Πίνακας 1.7:</b> Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα .....	57
<b>Πίνακας 2.1 :</b> Αλληλουχία και μοριακά βάρη των προς σύνθεση FRET- πεπτιδίων .....	108
<b>Πίνακας 3.1:</b> Αποτελέσματα προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης των αναστολέων στην ενεργό περιοχή της PPE (μέθοδος Glide-XP μεγάλης ακρίβειας) .....	150
<b>Πίνακας 3.2:</b> Υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα με την προσέγγιση MM-GBSA .....	151
<b>Πίνακας 3.3:</b> Τιμές των $\phi$ , S.I.E. και λοιπών παραγόντων από καταμετρήσεις πρωτονίων των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $K_i$ και $1/K_i$ στην αναστελόμενη υδρόλυση του Suc-AAA-pNA, με PPE (προσαρμογή δεδομένων σε μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge). .....	163
<b>Πίνακας 3.4:</b> Τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης (extra precision-docking) των ευνοϊκότερων διαμορφώσεων των FRET-πεπτιδικών παραγώγων στην ενεργό περιοχή της MPR .....	166
<b>Πίνακας 3.5:</b> Υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος με την προσέγγιση MM-GBSA .....	168

**Πίνακας 4.1:** Υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων Michaelis-Menten, των σταθερών ταχύτητας και των αντίστοιχων θερμοδυναμικών παραμέτρων ενεργοποίησης, για τα τρία FRET-πεπτιδικά υποστρώματα .....220

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**

<b>Σχήμα Ε1:</b> Υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού.....	1
<b>Σχήμα 1.1:</b> Η τριτοταγής δομή της Χυμοθρυψίνης με τα αμινοξέα του καταλυτικού της κέντρου. Η αρίθμηση των αμινοξέων αντιστοιχεί στη πρωτοταγή δομή του ενζυμικού μορίου. ....	3
<b>Σχήμα 1.2:</b> Γενικό σχήμα δράσης “τριών σταδίων” για σερινοπρωτεϊνάσες και κυστεϊνοπρωτεϊνάσες .....	4
<b>Σχήμα 1.3:</b> Ακυλίωση σερινοπρωτεϊνάσων: (α) Μεταφορά δύο πρωτονίων (σύστημα συμπλόκου μεταφοράς φορτίου) και (β) Μεταφορά ενός πρωτονίου (κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης) .....	5
<b>Σχήμα 1.4:</b> Υπόδειγμα ιονισμού του καταλυτικού κέντρου των σερινοπρωτεϊνάσων (σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου), σε διαλύματα αντίδρασης με τιμές pH μεταξύ 3.30 και 6.70 (α-Λυτική ενδοπεπτιδάση - EC 3.4.21.12). ....	7
<b>Σχήμα 1.5:</b> Σχηματικό διάγραμμα του καταλυτικού κέντρου των ασπαρτικοπρωτεϊνάσων όπου <b>(Α)</b> καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και πιθανοί υδρογονοδεσμοί με το καταλυτικό μόριο H <sub>2</sub> O και <b>(Β)</b> Έπαφές καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού οξέος. ....	16
<b>Σχήμα 1.6A-D:</b> <b>(Α)</b> αναπαράσταση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, <b>(Β)</b> Τετραεδρικό ενδιάμεσο, <b>(Γ)</b> μοντέλο για πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας, <b>(Δ)</b> η διάσπαση του δεσμού. ....	20
<b>Σχήμα 1.7:</b> Προτεινόμενη αναπαράσταση/απεικόνιση από <i>ab initio</i> προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των δύο καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού οξέος και του καταλυτικού μορίου H <sub>2</sub> O στην πεπτιδάση HIV-1 .....	21
<b>Σχήμα 1.8:</b> Διαδικασία πρόσδεσης ενός μικρού μορίου (αναστολέα, υποστρώματος) σε έναν υποδοχέα για την δημιουργία ενός μοριακού συμπλόκου .....	29
<b>Σχήμα 1.9:</b> Αναπαράσταση υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης .30	
<b>Σχήμα 1.10:</b> Βήματα μιας προσομοίωσης MD .....	40
<b>Σχήμα 1.11 :</b> Σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού .....	42
<b>Σχήμα 1.12 :</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης διπεπτιδίου .....	44
<b>Σχήμα 1.13:</b> Μηχανισμός σύζευξης με DCC .....	53
<b>Σχήμα 1.14:</b> Σύζευξη με την μέθοδο των μικτών ανυδριτών.....	54
<b>Σχήμα 1.15:</b> Σύζευξη με την μέθοδο των μικτών καρβονικών ανυδριτών .....	54
<b>Σχήμα 1.16:</b> Σύζευξη με την μέθοδο των αζιδίων. ....	56
<b>Σχήμα 1.17:</b> Μηχανισμός ρακεμίσωσης μέσω απόσπασης α-πρωτονίου υπό την επίδραση βάσης.....	59



<b>Σχήμα 1.18:</b> Μηχανισμός ρακεμίσωσης μέσω σχηματισμού οξαζολόνης υπό την επίδραση βάσης .....	59
<b>Σχήμα 1.19:</b> Μηχανισμός σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης κατά τη σύνθεση σε στερεή φάση .....	60
<b>Σχήμα 1.20:</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης πεπτιδίου σε στερεή φάση .....	62
<b>Σχήμα 1.21:</b> Απλός μηχανισμός δύο σταδίων (Henri-Michaelis-Menten) .....	64
<b>Σχήμα 1.22:</b> Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης Michaelis-Menten .....	66
<b>Σχήμα 1.23:</b> Η $K_m$ μπορεί να είναι ίση ή διαφορετική από την $K_s$ .....	68
<b>Σχήμα 1.24:</b> Ο ελάχιστος μηχανισμός δράσης, των τριών σταδίων, που ισχύει για τις πρωτεάσες .....	71
<b>Σχήμα 1.25:</b> Μοντέλο I, όπου το ένζυμο υπάρχει σε τρεις ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική.....	75
<b>Σχήμα 1.26:</b> Μοντέλο II, όπου το ένζυμο υπάρχει σε τέσσερις ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική.....	76
<b>Σχήμα 1.27:</b> Μοντέλο III, όπου το ένζυμο υπάρχει σε πέντε ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική .....	76
<b>Σχήμα 2.1:</b> Μεθοδολογία εύρεσης, σχεδιασμού και ταυτοποίησης υποψήφιων μορίων ως υποστρωμάτων του ενζύμου MPR.....	100
<b>Σχήμα 2.2α-ε:</b> Υποπεριοχές πρόσδεσης του ενζύμου MPR και κρίσιμα κατάλοιπα με τα οποία αλληλεπιδρά το υπόστρωμα HLSFM .....	102
<b>Σχήμα 2.3α-β:</b> Διαμορφώσεις του καταλυτικού μορίου $H_2O$ στην δομή της MPR ..	104
<b>Σχήμα 2.4:</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GFY-pNA ( <b>FS1</b> ) .....	109
<b>Σχήμα 2.5:</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-SFY-pNA ( <b>FS2</b> ) .....	110
<b>Σχήμα 2.6:</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GNSFY-pNA ( <b>FS3</b> ) .....	110
<b>Σχήμα 2.7:</b> Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GFI-pNA ( <b>FS4</b> ) .....	111
<b>Σχήμα 2.8:</b> Πρωτεολυτική διάσπαση πεπτιδίου και εκπομπή φθορισμού μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster .....	130
<b>Σχήμα 3.1:</b> Πιθανό σχήμα αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την PPE.....	142
<b>Σχήμα 4.1:</b> Μηχανισμός ακυλίωσης της PPE ως τον σχηματισμό του ακυλ-ενζύμου ( $E_{acyl}$ ) κατά την διάρκεια υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA διαμέσου του "συμπλόκου μεταφοράς φορτίου (Charge Relay System). .....	214
<b>Σχήμα 4.2:</b> (α) Πιθανός μηχανισμός αντιστρεπτής αναστολής της PPE (αναστολέας: $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ ; υπόστρωμα: Suc-AAA-pNA), (β) εννοιολογική σύντομη εκδοχή του μηχανισμού αντιστρεπτής αναστολής της PPE .....	215
<b>Σχήμα 4.3:</b> Πιθανός μηχανισμός δράσης του ενζύμου MPR (υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA) .....	223
<b>Σχήμα 4.4:</b> Η σειρά αντιδράσεων του μηχανισμού, του Σχήματος 4.3. ....	225

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 3.1:** Καμπύλη Michaelis-Menten της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με το υπόστρωμα Suc-AAA-pNa. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/K_m$ . .....140

**Διάγραμμα 3.2:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A.**  $(k_{cat}/K_m)=f(pH)$ , **B.**  $(k_{cat})=f(pH)$  και **Γ.**  $(1/K_m)=f(pH)$  για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την PPE. Το Διάγραμμα **Δ** αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των **A-Γ** .....141

**Διάγραμμα 3.3:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A** και **B** [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], **Γ** [ $(k_{cat})=f(T)$ ], **Δ** [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNa από την PPE. Το Διάγραμμα **E** αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των **A, B, Γ** και **Δ**. .....145

**Διάγραμμα 3.4:** Εξάρτηση των (α)  $k_{cat}/K_m$  και (β)  $k_{cat}$  από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και παραγωγή θερμοδυναμικών δεδομένων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις .....146

**Διάγραμμα 3.5:** Ενεργειακό διάγραμμα των επιμέρους σταδίων των αντιδράσεων υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNa από την PPE .....146

**Διάγραμμα 3.6:** Γραφική παρασάση της συνάρτησης  $(k_{cat}/K_m)=f(n)$ , για την υδρόλυση του υποστρώματος **Suc-AAA-pNa** από την PPE .....148

**Διάγραμμα 3.7:** Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας των συμπλόκων PPE-αναστολέων ( $K_i$ ) με το υπόστρωμα Suc-AAA-pNa: (**α**) για τον αναστολέα  $CF_3CO-Lys-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ , (**β**) για τον αναστολέα  $CF_3CO-Val-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ , (**γ**) για τον αναστολέα  $CF_3CO-Asp-Ala-NH-Ph-p-CF_3$  και (**δ**) Συγκριτική. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των σταθερών  $K_i$  για κάθε αναστολέα ( $\theta = 25^\circ C$ ,  $pH = 8.00$ ).....157

**Διάγραμμα 3.8:** Εξάρτηση της σταθεράς σχηματισμού του κάθε συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα  $K_i$  ( $=1/K_i$ ) από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων τιμών  $pK_a$  για τους αναστολείς: **CF<sub>3</sub>C(O)-K A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (κόκκινο) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.045 \pm 0.002$ ,  $pK_{a1} = 6.872 \pm 0.096$ ,  $pK_{a2} = 9.469 \pm 0.116$ , **CF<sub>3</sub>C(O)-V A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (πράσινο) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.021 \pm 0.011$ ,  $pK_{a1} = 7.666 \pm 0.610$ ,  $pK_{a2} = 8.745 \pm 0.116$  και **CF<sub>3</sub>C(O)-D A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (μπλέ) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.009 \pm 0.002$ ,  $pK_{a1} = 7.509 \pm 0.213$ ,  $pK_{a2} = 8.326 \pm 0.260$ ..159

**Διάγραμμα 3.9:** Οι εξαρτήσεις της παραμέτρου  $K_i$ , από το ατομικό κλάσμα δευτερίου ( $n$ ), για τους αντιστρεπτούς αναστολείς **CF<sub>3</sub>C(O)-K A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (μπλε), **CF<sub>3</sub>C(O)-V A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (πράσινο) και **CF<sub>3</sub>C(O)-D A-NHPh-p-CF<sub>3</sub>** (κόκκινο): προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση 2.8 [A] και στην φθίνουσα εκθετική εξίσωση [B] .....164

**Διάγραμμα 3.10:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού σε  $\lambda_{em} = 340 - 500$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm της δράσης της MPR επί των FRET-παραγώγων (**α**) Abz-GFY-pNA, (**β**) Abz-SFY-pNA, (**γ**) Abz-GNSFY-pNA και (**δ**) Abz-GFI-pNA .....183

**Διάγραμμα 3.11:** Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα **Abz-GFY-pNA**. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/K_m$  ( $\theta = 37^\circ C$ ,  $pH = 3.70$ ).....184

<b>Διάγραμμα 3.12:</b> Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα <b>Abz-SFY-pNA</b> . Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων $V_{max}$ , $K_m$ , $k_{cat}$ και $k_{cat}/K_m$ ( $\theta = 37^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 3.70$ ) .....	184
<b>Διάγραμμα 3.13:</b> Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα <b>Abz-GFI-pNA</b> . Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων $V_{max}$ , $K_m$ , $k_{cat}$ και $k_{cat}/K_m$ ( $\theta = 37^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 3.70$ ). .....	185
<b>Διάγραμμα 3.14 :</b> Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: <b>A</b> [ $(k_{cat}/K_m)=f(\text{pH})$ ], <b>B</b> [ $(k_{cat})=f(\text{pH})$ ] και <b>Γ</b> [ $(1/K_m)=f(\text{pH})$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του Abz-GFY-pNA από την MPR. Το Διάγραμμα <b>Δ</b> αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των <b>A-B</b> . .....	188
<b>Διάγραμμα 3.15 :</b> Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: <b>A, B</b> [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], <b>Γ</b> [ $(k_{cat})=f(T)$ ] και <b>Δ</b> [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος <b>Abz-GFY-pNA</b> από την MPR .....	192
<b>Διάγραμμα 3.16 :</b> Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: <b>A, B</b> [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], <b>Γ</b> [ $(k_{cat})=f(T)$ ] και <b>Δ</b> [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος <b>Abz-SFY-pNA</b> από την MPR.....	194
<b>Διάγραμμα 3.17:</b> Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: <b>A, B</b> [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], <b>Γ</b> [ $(k_{cat})=f(T)$ ] και <b>Δ</b> [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος <b>Abz-GFI-pNA</b> από την MPR.....	196
<b>Διάγραμμα 3.18:</b> Εξάρτηση των $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος <b>Abz-GFY-pNA</b> από την MPR). .....	197
<b>Διάγραμμα 3.19:</b> Εξάρτηση των $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος <b>Abz-SFY-pNA</b> από την MPR). .....	198
<b>Διάγραμμα 3.20:</b> Εξάρτηση των $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος <b>Abz-GFI-pNA</b> από την MPR) .....	199
<b>Διάγραμμα 3.21:</b> Ενεργειακό διάγραμμα των επιμέρους σταδίων των αντιδράσεων υδρόλυσης των υποστρωμάτων (i) Abz-GFY-pNA, (ii) Abz-SFY-pNA και (iii) Abz-GFI-pNA από την MPR. Οι ενεργειακές διαφορές είναι εμφανείς. Οι καμπύλες σχεδιάστηκαν με χρήση των υπολογισθέντων τιμών των σταθερών ταχύτητας $k_1$ , $k_{-1}$ , $k_2$ και $k_3$ , που υπολογίστηκαν για το ένζυμο αυτό από τα Διαγράμματα εξάρτησης των $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ ως προς την απόλυτη θερμοκρασία και με την υπόθεση ότι η τιμή του προ-εκθετικού παράγοντα Arrhenius ισούται προς $6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ για όλα τα στάδια ...	200
<b>Διάγραμμα 3.22:</b> Γραφική παρασάση των συναρτήσεων: <b>A</b> [ $k_{cat}/K_m=f(n)$ ], <b>B</b> [ $k_{cat}=f(n)$ ] και <b>Γ</b> [ $K_m=f(n)$ ] για την υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA από την MPR και υπολογισμός σημαντικών παραμέτρων και <b>Δ</b> συγκριτική αναπαράσταση των <b>A - Γ</b> .....	203
<b>Διάγραμμα 3.23:</b> Πρότυπη καμπύλη Abz-G για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατά την μέτρηση της δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή .....	206

<b>Διάγραμμα 3.24:</b> Πρότυπη καμπύλη Abz-G για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατά την μέτρηση της δραστηριότητας των παρασκευασμάτων της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή.....	207
<b>Διάγραμμα 3.25:</b> Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών MPR (B1-B4) με βάση τον χρόνο πήξης του γάλακτος .....	208
<b>Διάγραμμα 3.26:</b> Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών MPR (B1-B4) με βάση την τιμή των προσδιοριζόμενων I.U. ....	209

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ**

<b>Εξίσωση 1.1:</b> Εξίσωση Michaelis-Menten .....	65
<b>Εξίσωση 1.6:</b> Εξίσωση Arrhenius .....	71
<b>Εξίσωση 1.7:</b> Εξάρτηση της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ από την θερμοκρασία $T$ .....	71
<b>Εξίσωση 1.7α:</b> Εξάρτηση (δεύτερη εξίσωση) της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ από την θερμοκρασία $T$ .....	72
<b>Εξίσωση 1.8:</b> Εξάρτηση της παραμέτρου $k_{cat}$ από την θερμοκρασία $T$ .....	72
<b>Εξίσωση 1.9:</b> Εξάρτηση της παραμέτρου $K_m$ από την θερμοκρασία $T$ .....	72
<b>Εξίσωση 1.10:</b> Εξίσωση υπολογισμού θερμοδυναμικών σταθερών ενεργοποίησης .....	73
<b>Εξίσωση 1.11:</b> Γενική εξίσωση εξάρτησης παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης .....	74
<b>Εξίσωση 1.12:</b> Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με δύο $pK_a$ ) .....	75
<b>Εξίσωση 1.13:</b> Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με τρεις $pK_a$ ) .....	76
<b>Εξίσωση 1.14:</b> Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με τέσσερεις $pK_a$ ) .....	76
<b>Εξίσωση 1.15:</b> Εξίσωση Gross-Butler-Kresge .....	78
<b>Εξίσωση 1.16:</b> Εξίσωση υπολογισμού του ισοτοπικού παράγοντα κλασμάτωσης $\phi$ .....	80
<b>Εξίσωση 2.2α-β:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική κατάσταση ισορροπίας (G) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση (T) .....	89
<b>Εξίσωση 2.3:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική (G) και ένα κατά την τελική κατάσταση (P) .....	89
<b>Εξίσωση 2.4:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (T), όπου $\phi_1^G \approx 1$ και $\phi_2^G \approx 1$ .....	89

<b>Εξίσωση 2.5:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική ( <b>G</b> ) και δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση ( <b>T</b> ) .....	89
<b>Εξίσωση 2.6:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική ( <b>G</b> ) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση ( <b>T</b> ) .....	89
<b>Εξίσωση 2.7:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική ( <b>G</b> ) και δύο κατά την μεταβατική κατάσταση ( <b>T</b> ) .....	89
<b>Εξίσωση 2.8-2.8α:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την μεταβατική κατάσταση ( <b>T</b> ), όπου $\varphi^G \approx 1$ .....	89
<b>Εξίσωση 2.9:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική ( <b>G</b> ) και δύο κατά την μεταβατική κατάσταση ( <b>T</b> ) .....	90
<b>Εξίσωση 2.10:</b> Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται $\nu$ πρωτόνια κατά την διάρκεια μίας κατ' επίφαση ή ιδεατής μεταβατικής κατάστασης .....	90
<b>Εξίσωση 2.11:</b> Εξίσωση Morrison .....	96



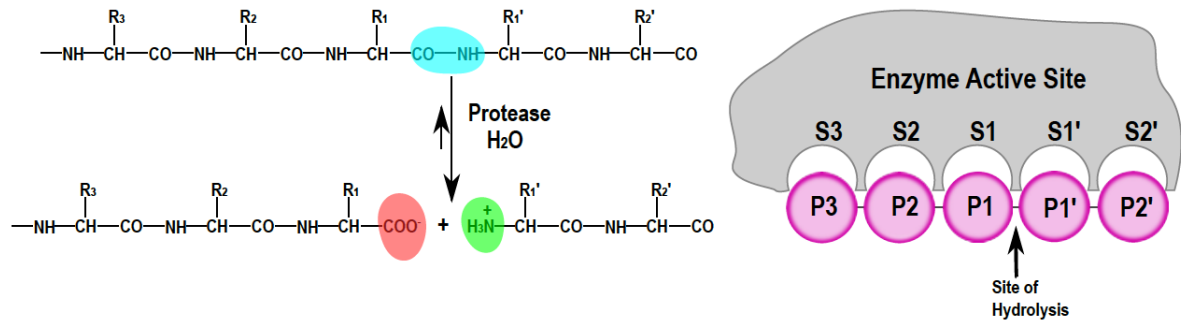
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1. Πρωτεολυτικά Ένζυμα

Ο όρος "πρωτεάση" είναι απόλυτα και συστηματικά συνώνυμος με τον όρο "πεπτιδάση" και αναφέρεται σε εκείνες τις υδρολάσες που καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση πεπτιδικών δεσμών (EC 3.4.\_.\_).



**Σχήμα Ε1:** Υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού

Οι πρωτεάσες ή πεπτιδάσες χωρίζονται σε δύο υποομάδες ενζύμων, τις ενδοπεπτιδάσες ή "πρωτεΐνάσες" (EC 3.4.21-99.\_), οι οποίες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται εντός του μορίου της πρωτεΐνης και τις εξωπεπτιδάσες (EC 3.4.11-19.\_), οι οποίες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται είτε στο αμινο-τελικό είτε στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι πρωτεασών που κατατάσσονται σε ξεχωριστές ομάδες. Παραπέρα διακρίσεις γίνονται με βάση την σύσταση του καταλυτικού τους κέντρου, τον τρόπο με τον οποίο καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση πεπτιδικών ή εστερικών δεσμών και άλλα ειδικότερα κριτήρια σύμφωνα με τους κανόνες της συστηματικής κατάταξης και ονοματολογίας των ενζύμων.

Οι περισσότεροι μελετημένες υποομάδες πρωτεϊνασών είναι οι:

- *Σερινοπρωτεΐνάσες* (EC 3.4.21.\_)
- *Κυστεϊνοπρωτεΐνάσες* (EC 3.4.22.\_)
- *Ασπαραγγοπρωτεΐνάσες* (EC 3.4.23.\_)
- *Μεταλλοπρωτεΐνάσες* (EC 3.4.24.\_)

Οι πρωτεάσες είναι σημαντικοί πιθανοί στόχοι στην ιατρική λόγω των σημαντικών ρυθμιστικών ρόλων τους στη ζωή. Περισσότερες από 50 ανθρώπινες πρωτεάσες έχουν βρεθεί, των οποίων οι μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα αμινοξέα οδηγούν σε μια σειρά από κληρονομικές και γενετικές ασθένειες. Επιπλέον έχουν παρασκευαστεί φάρμακα για να εμποδίσουν τις πρωτεάσες που απαιτούνται για τον αναδιπλασιασμό του ιού HIV και αυτήν την περίοδο θεωρούνται ως τα



αποτελεσματικότερα φάρμακα, με την ευρεία έννοια του όρου, για την καταπολέμηση του AIDS. Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες πρωτεασών αναπτύσσονται για να θεραπεύσουν το πνευμονικό εμφύσημα, την υπέρταση, τις παρασιτικές, τις μυκητιακές και τις προερχόμενες από ιούς μολύνσεις, και γενικά τις φλεγμονώδεις, ανοσολογικές, αναπνευστικές και καρδιαγγειακές ασθένειες και νευρογενείς διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της ασθένειας του Alzheimer, αλλά και την θεραπεία φλεγμονών της στοματικής κοιλότητας, των προβλημάτων στην πήξη του αίματος και των κακοηθών ασθενειών.

Ακόμη, οι πρωτεάσες είναι βασικοί ρυθμιστές της ζωής των εντόμων, διαφόρων γεωργικών παρασίτων, καθώς και της αύξησης και της υγείας των ζώων. Έτσι, η μελέτη τέτοιων πρωτεασών μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της οικονομίας με την βελτίωση της υγείας των ζώων, την προστασία των συγκομιδών μέσω νέων ζιζανιοκτόνων και φυτοφαρμάκων και την γρηγορότερη ανάπτυξη φυτών και ζώων.

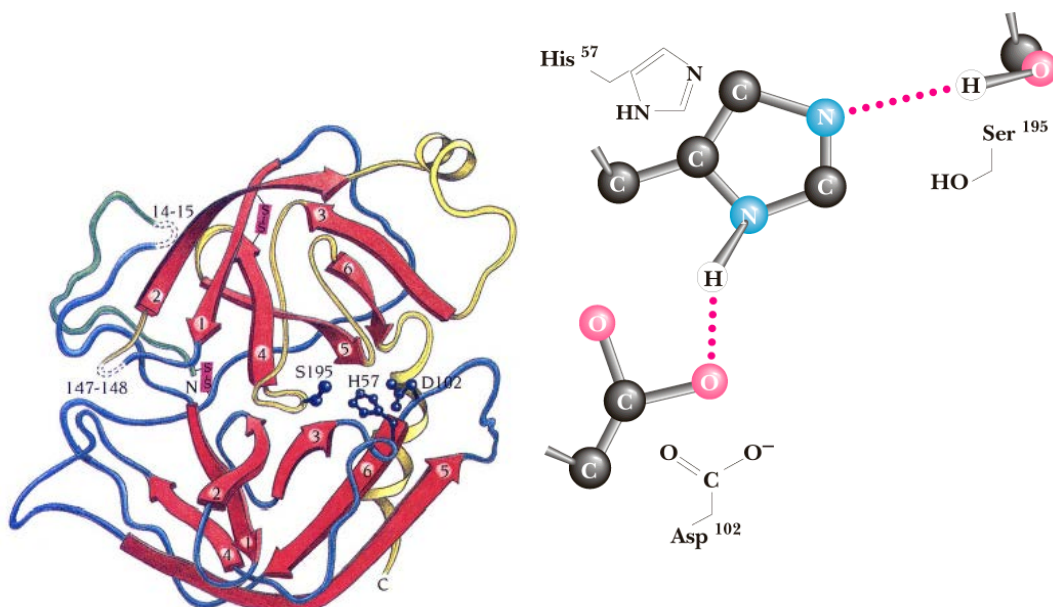
Το εύρος των βιοτεχνολογικών εφαρμογών των πρωτεασών εκτείνεται και σε άλλους τομείς όπως είναι η παραγωγή τροφίμων και ποτών, οι τεχνικές εφαρμογές (Βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού, απορρυπαντικά, επεξεργασία των δορών και των δερμάτων, κ.α.) και στην Οργανική σύνθεση.

## 1.1. Σερινοπρωτεϊνάσες

### 1.1.1 Εισαγωγή

Η υποομάδα των σερινοπρωτεϊνάσων περιλαμβάνει ένζυμα που προέρχονται από διάφορες πηγές όπως είναι ιοί, βακτήρια, ευκαρυωτικοί και λοιποί οργανισμοί. Μεταξύ των σημαντικότερων και περισσότερο μελετημένων σερινοπρωτεϊνάσων είναι οι: Χυμοθρυψίνη (EC 3.4.21.1), Θρυψίνη (EC 3.4.21.4), Θρομβίνη (EC 3.4.21.5), Πλασμίνη (EC 3.4.21.7), α-Λυτική ενδοπεπτιδάση (EC 3.4.21.12), Καθεψίνη G (EC 3.4.21.20), Συμπυλισίνη (EC 3.4.21.62) και Παγκρεατική Ελαστάση (EC 3.4.21.71)<sup>1</sup>.

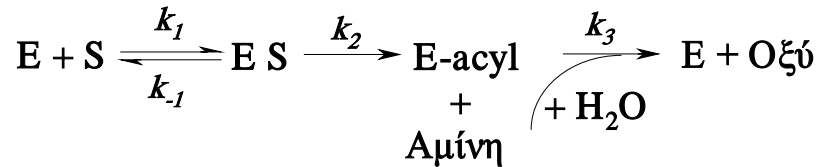
Υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες του μηχανισμού δράσης μεταξύ σερινοπρωτεϊνάσων, παρότι σε κάποια ένζυμα διαφέρουν οι αρχές εξέλιξης τους. Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, την ύπαρξη μιας ενεργού σερίνης (**S**) ως πυρηνόφιλου. Το καταλυτικό κέντρο των σερινοπρωτεϊνάσων συνίσταται από μια τριάδα αμινοξέων, Ασπαρτικό οξύ - **D<sup>102</sup>**, Ιστιδίνη - **H<sup>57</sup>**, Σερίνη - **S<sup>195</sup>** (αρίθμηση Χυμοθρυψίνης), δηλαδή μία καταλυτική τριάδα (**Σχήμα 1.1**). Ο γεωμετρικός προσανατολισμός των δραστικών αυτών καταλοίπων, ανεξάρτητα από την συγκεκριμένη σερινοπρωτεϊνάση, είναι παρόμοιος και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις επιμέρους δευτεροταγείς δομές ούτε και την τριτοταγή δομή τους<sup>2</sup>.



**Σχήμα 1.1:** Η τριτοταγής δομή της Χυμοθρυψίνης με τα αμινοξέα του καταλυτικού της κέντρου. Η αρίθμηση των αμινοξέων αντιστοιχεί στη πρωτοταγή δομή του ενζυμικού μορίου.

### 1.1.2 Μηχανισμός δράσης των Σερινοπρωτεϊνών

Ένα κοινά αποδεκτό γενικό σχήμα δράσης τόσο για σερινοπρωτεϊνάσες όσο και για κυστεϊνοπρωτεϊνάσες είναι το ακόλουθο<sup>3,4</sup>:



**Σχήμα 1.2:** Γενικό σχήμα δράσης “τριών σταδίων” για σερινοπρωτεϊνάσες και κυστεϊνοπρωτεϊνάσες.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι σερινοπρωτεϊνάσες και κυστεϊνοπρωτεϊνάσες χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό διπλής αντικατάστασης στον οποίο η δραστική **S** (ή **C**) του καταλυτικού κέντρου ακυλιώνεται με ταυτόχρονη απομάκρυνση μιας αμίνης ενώ σχηματίζεται το ενδιάμεσο ακυλ-ένζυμο, το οποίο με τη σειρά του υδρολύεται για να δώσει το καρβοξυλικό προϊόν (οξύ). Η απακυλίωση είναι ένα στάδιο μηχανιστικά ανάλογο της ακυλίωσης<sup>5</sup>. Συγκεκριμένα, το οξυγόνο του H<sub>2</sub>O (διαλύτης), που λαβαίνει μέρος στην αντίδραση, γίνεται αρκετά πυρηνόφιλο εξαιτίας της ύπαρξης δεσμού υδρογόνου με το άζωτο της δραστικής **H** με αποτέλεσμα να μπορεί να διασπά το ακυλ-ένζυμο, μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου και να παράγει το δεύτερο προϊόν (οξύ)<sup>4</sup>. Αρκετά δομικά και άλλα χαρακτηριστικά, τα οποία διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο (όπως τα αμινοξέα του πρωτεϊνικού σκελετού που απαρτίζουν τις **S**<sub>1</sub>, **S**<sub>2</sub>,... κλπ υποπεριοχές της ενεργού περιοχής), φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο την ακυλίωση όσο και την απακυλίωση.

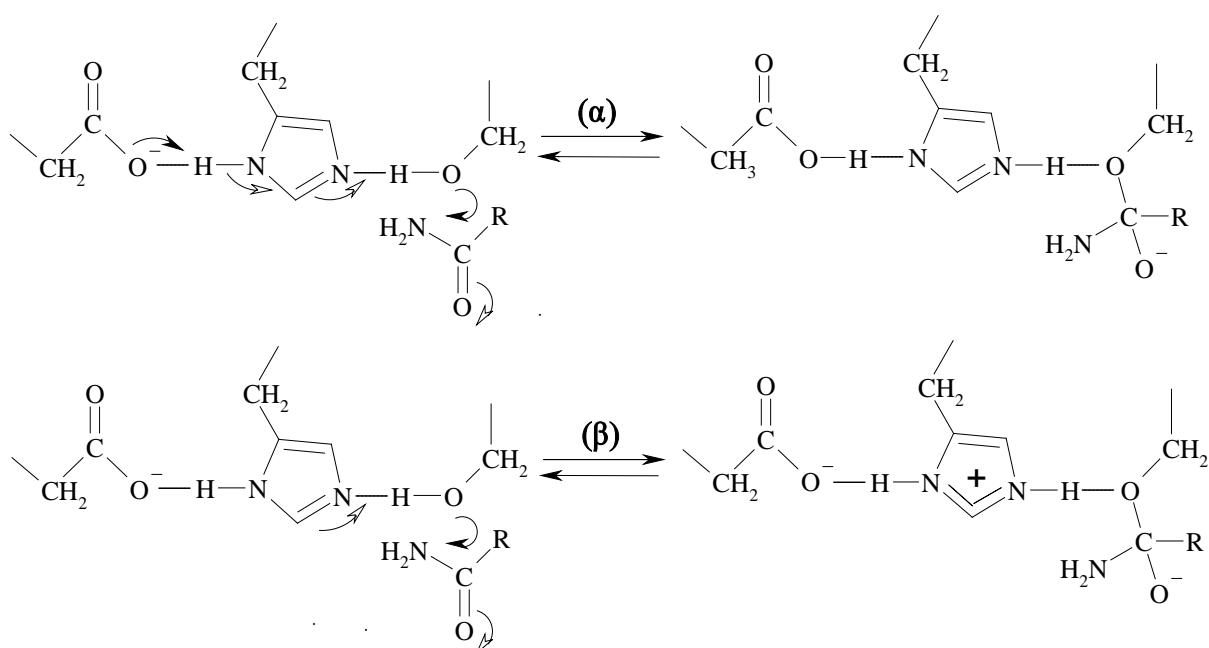
Έως σήμερα, έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί τρόποι δράσης της καταλυτικής τριάδας των σερινοπρωτεϊνών (**D**<sup>102</sup>/**H**<sup>57</sup>/**S**<sup>195</sup>, αρίθμηση Χυμοθρυψίνης) από τους οποίους οι περισσότεροι αποδεκτοί είναι οι εξής:

- το "σύστημα ή σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου" (Σ.Μ.Φ.) και
- η "κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης"<sup>5,6</sup>

Το **σύστημα μεταφοράς φορτίου** (Charge Relay System)<sup>6</sup> συνίσταται από αλυσίδες δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πυρηνόφιλης **S**<sup>195</sup> και του ιμιδαζολίου της **H**<sup>57</sup>, είτε και μεταξύ του α-καρβοξυλίου του **D**<sup>102</sup> και του ιμιδαζολίου της **H**<sup>57</sup> (αρίθμηση Χυμοθρυψίνης). Δεσμοί υδρογόνου έχουν βρεθεί, επίσης, μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων και άλλων ομάδων του σκελετού των σερινοπρωτεϊνών<sup>7</sup>. Ονομάστηκε

σύστημα μεταφοράς φορτίου επειδή το αρνητικό φορτίο μεταφέρεται, μέσω δεσμών υδρογόνου, χωρίς να εντοπίζεται σε ένα συγκεκριμένο καταλυτικό κατάλοιπο, οδηγώντας σε αύξηση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της καταλυτικής **S** με παράλληλη αύξηση της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου. Αυτό δεν θα συνέβαινε αν το αρνητικό φορτίο ήταν εντοπισμένο σε μια γειτονική θέση της καταλυτικής **S**. Το **D** της καταλυτικής τριάδας, εκτός από τη διατήρηση του κατάλληλου προσανατολισμού του ιμιδαζολίου της καταλυτικής **H**, δρα και ως τελική βάση δεσμεύοντας ένα πρωτόνιο, κατά την κατάλυση, ενώ η καταλυτική **H** λειτουργεί ως ενδιάμεσο για την μεταφορά του πρωτονίου<sup>8</sup> (Σχήμα 1.3-α).

Στην κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης (General Acid-Base Catalysis)<sup>5,6</sup>, το **D** της καταλυτικής τριάδας σταθεροποιεί ηλεκτροστατικά, με το αρνητικό φορτίο του, την θετικά φορτισμένη **H** κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, κανένα πρωτόνιο δεν μεταφέρεται προς το **D**, ενώ η **H** λειτουργεί ως δότης ενός πρωτονίου (ακυλίωση) και στην συνέχεια ως δέκτης ενός πρωτονίου (απακυλίωση) ώστε να είναι δυνατή η κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης<sup>5</sup> (Σχήμα 1.3-β).



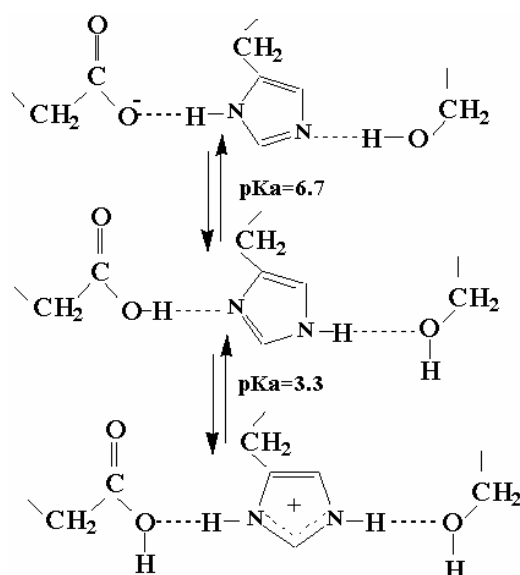
**Σχήμα 1.3:** Ακυλίωση σερινοπρωτεϊνάσων: (α) Μεταφορά δύο πρωτονίων (σύστημα συμπλόκου μεταφοράς φορτίου) και (β) Μεταφορά ενός πρωτονίου (κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης)

Χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τον αριθμό και το είδος των πρωτονίων που μεταφέρονται κατά την πορεία από την αρχική στην μεταβατική κατάσταση των

σταδίων ακυλίωσης και απακυλίωσης των σερινοπρωτεΐναισών προκύπτουν με εφαρμογή της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων<sup>2</sup>. Για παράδειγμα εφαρμόζοντας αυτή τη μεθοδολογία και έχοντας ως πρότυπο ένζυμο την Ελαστάση από ανθρώπινα λευκοκύτταρα, έχει βρεθεί ότι συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματά της με περισσότερα από τέσσερα αμινοξέα και με σχετικά μικρές  $K_m$ , έδειξαν μεταφορά δύο πρωτονίων κατά την πορεία από την αρχική στην μεταβατική κατάσταση του σταδίου ακυλίωσης του ενζύμου (κατάλυση με σύστημα μεταφοράς φορτίου). Όμως, συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματά της με λιγότερα από τρία αμινοξέα και με σχετικά μεγάλες  $K_m$ , έδειξαν μεταφορά ενός πρωτονίου κατά την ίδια πορεία (κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης)<sup>4</sup>, όπως φαίνεται ενδεικτικά στο **Σχήμα 1.3**.

Κατά τη διαδικασία της ακυλίωσης των σερινοπρωτεΐναισών η καταλυτική **S**, η οποία έχει δώσει το πρωτόνιο της στην καταλυτική **H** και έχει ήδη γίνει αρκετά πυρηνόφιλη ώστε να προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος. Η πυρηνόφιλη προσβολή από τη **S** οδηγεί στην δημιουργία του ακυλ-ένζυμου μέσω ενός τετραεδρικού **οξυανιόντος**, το οποίο σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου με συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου, μέσω της **οπής του οξυανιόντος**<sup>3,9,10</sup>. Ο σχηματισμός της οπής του οξυανιόντος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατάλυση από τις σερινοπρωτεΐνάσες. Το τετραεδρικό **οξυανιόν** μπορεί να ανιχνευθεί, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, και μάλιστα σε ειδικές περιπτώσεις γίνεται διακριτό ενδιάμεσο μικρής διάρκειας ζωής<sup>9</sup>.

Στην περίπτωση των σερινοπρωτεΐναισών το κατάλοιπο της καταλυτικής **H** χάνει το πρωτόνιο του σε τιμή  $pH \approx 3.30$ , ενώ για το ελεύθερο αμινοξύ έχει βρεθεί μια τιμή  $pK_a = 6.40$ . Το κατάλοιπο του καταλυτικού **D** χάνει το πρωτόνιο του σε τιμή  $pH = 6.70$ , ενώ για το ελεύθερο **D** έχει βρεθεί μια τιμή  $pK_a = 3.60$ . Επομένως σε μέσα (διαλύματα) αντίδρασης με τιμές  $pH$  μεταξύ 3.30 και 6.70 και τα δύο αμινοξέα είναι ουδέτερα, ενώ σε μέσα (διαλύματα) τιμών  $pH > 6.70$  το ένζυμο αποκτά τη μέγιστη καταλυτική του δραστηριότητα, αφού τότε το καταλυτικό **D** υφίσταται στην αρνητικά ιονισμένη μορφή  $D_{(COO^-)}$ <sup>3</sup>, σύμφωνα με το **Σχήμα 1.4**.



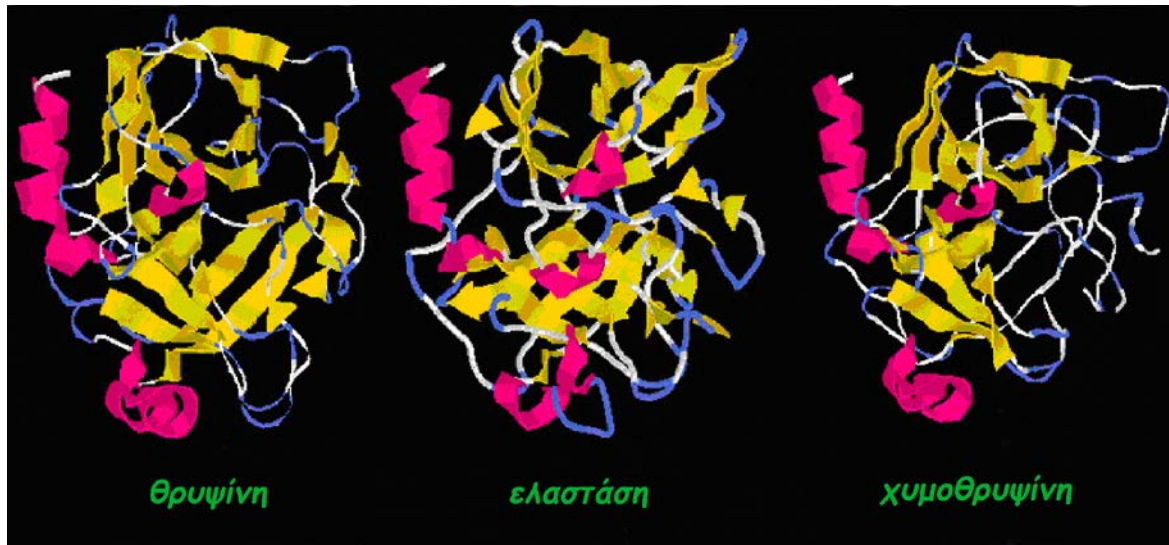
**Σχήμα 1.4:** Υπόδειγμα ιονισμού του καταλυτικού κέντρου των σερινοπρωτεϊνάσων (σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου), σε διαλύματα αντίδρασης με τιμές pH μεταξύ 3.30 και 6.70 ( $\alpha$ -Λυτική ενδοπεπτιδάση - EC 3.4.21.12).

Τα παραπάνω συμπεράσματα προέκυψαν μετά από εκλεκτικό εμπλουτισμό με  $^{13}\text{C}$  του **C2** της μοναδικής καταλυτικής **H** της βακτηριακής σερινοπρωτεϊνάσης  **$\alpha$ -Λυτική ενδοπεπτιδάση** (EC 3.4.21.12)<sup>11</sup>. Έτσι, μελετήθηκε απ' ευθείας η καταλυτική τριάδα **D/H/S** του ενζύμου αυτού με φασματοσκοπία **NMR**. Βρέθηκε ότι σε διάλυμα αντίδρασης τιμών  $\text{pH} < 3.30$  το ιμιδαζόλιο της καταλυτικής **H** προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά θετικό φορτίο, ενώ σε τιμές  $\text{pH} > 6.70$  το καταλυτικό **D** χάνει, αντίστοιχα ένα πρωτόνιο. Άρα, σε διαλύματα αντίδρασης τιμών  $3.30 < \text{pH} < 6.70$ , τα καταλυτικά κατάλοιπα **H** και **D** δεν κατέχουν ηλεκτρικό φορτίο, ενώ η καταλυτική **H** παίζει έναν επιπλέον ρόλο<sup>12</sup>. Θωρακίζει το αρνητικά φορτισμένο **D** από τα μόρια του διαλύτη -  $\text{H}_2\text{O}$  εξασφαλίζοντας στο ανιόν αυτό ένα υδρόφοβο περιβάλλον έτσι ώστε να μπορεί να δεχθεί ένα κατιόν υδρογόνου μόνο από την καταλυτική **H** και όχι από κάποιο μόριο  $\text{H}_2\text{O}$ .

Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης των σερινοπρωτεϊνάσων που περιγράφηκε είναι ο γενικότερα αποδεκτός, ωστόσο υπάρχουν μέλη της υποομάδας αυτής τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τα ενεργά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου και τον μηχανισμό δράσης.

### 1.1.3 Οικογένεια Χυμοθρυψίνης (υποομάδας σερινοπρωτεϊνών)

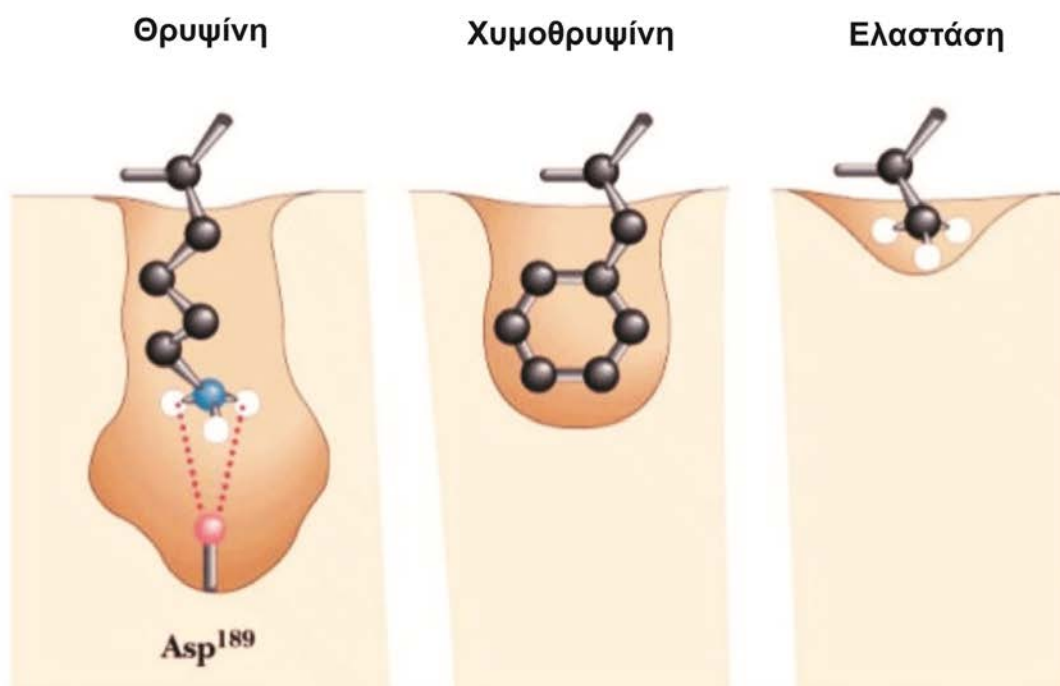
Η διατήρηση της δομής ανάμεσα στα μέλη αυτής της οικογένειας είναι προφανής κυρίως στο σχηματισμό της καταλυτικής τριάδας και στις αμινοξικές αλληλουχίες που σχηματίζουν τις ενεργές περιοχές. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται τόσο σε ανώτερους οργανισμούς όσο και σε μικροοργανισμούς (βακτήρια κ.α.). Ως εκπρόσωποι της οικογένειας αυτής μπορούν να αναφερθούν η Θρυψίνη, η Χυμοθρυψίνη και η Ελαστάση<sup>13-15</sup> (**Εικόνα 1.1**).



**Εικόνα 1.1:** Ένζυμα-εκπρόσωποι των σερινοπρωτεϊνών της οικογένειας της χυμοθρυψίνης.

Τα ένζυμα αυτά έχουν παρόμοια πρωτεϊνική αναδίπλωση και τα ίδια καταλυτικά κατάλοιπα (**D<sup>102</sup>/ H<sup>57</sup>/S<sup>197</sup>**). Οι ενεργές περιοχές δημιουργούνται από: (α) τη ρωγμή πρόσδεσης του υποστρώματος, όπου μη ειδικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος, (β) τις εξειδικευμένες υποδοχές για την πρόσδεση του υποστρώματος, (γ) την καταλυτική τριάδα **D<sup>102</sup>/ H<sup>57</sup>/S<sup>197</sup>** και (δ) την οπή οξανιόντος. Η θήκη πρόσδεσης του υποστρώματος της πρωτεάσης επιτρέπει στο υπόστρωμα να προσδένεται στην πρωτεάση και καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου για το υπόστρωμα<sup>16</sup>.

Για παράδειγμα, η θρυψίνη διασπά πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών μετά από κατάλοιπα με μακριές θετικά φορισμένες αλυσίδες (αργινίνη και λυσίνη). Η πρόσδεση μιας κατάλληλης πλευρικής αλυσίδας μέσα στην υποπεριοχή αυτή τοποθετεί τον παρακείμενο πεπτιδικό δεσμό μέσα στην ενεργό περιοχή προετοιμάζοντας την υδρόλυση (**Εικόνα 1.2**).



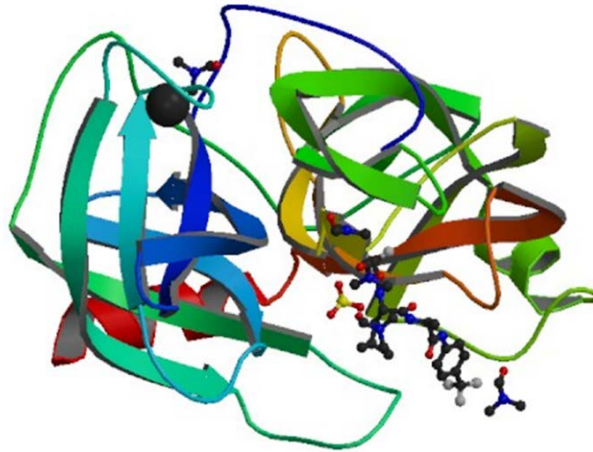
**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση ενεργών περιοχών θρυψίνης, χυμοθρυψίνης και ελαστάσης.

Έτσι, η ουσιαστική διαφορά μεταξύ των μελών της οικογένειας της χυμοθρυψίνης είναι η διαφορετική εξειδίκευση, που επιδεικνύει κάθε ένζυμο για το υπόστρωμά του.

#### 1.1.4 Η Ελαστάση ως εισαγωγή στην Ενζυμική Κινητική και στις υπολογιστικές μεθόδους

Οι ελαστάσες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα (σερινοπρωτεϊνάσες) της οικογένειας της θρυψίνης, τα οποία κατά κύριο λόγο υδρολύουν πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού στους πνεύμονες, στις αρτηρίες, στο δέρμα και στους ιστούς<sup>17,18</sup>. Διαφορετικές ελαστάσες έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων μελετών, λόγω του σημαντικού τους ρόλου σε διάφορες ασθένειες όπως το εμφύσημα<sup>19</sup>, η αρθρίτιδα<sup>20</sup>, η παγκρεατίτιδα<sup>21</sup> και η κυστική ίνωση<sup>22</sup>. Η παγκρεατική ελαστάση χοίρου (PPE) είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο του οποίου η κρυσταλλική δομή έχει προσδιοριστεί σε ανάλυση 1.65 Å και έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τις ανθρώπινες ελαστάσες (**Εικόμα 1.3**)<sup>23</sup>.





**Εικόνα 1.3:** Τρισδιάστατη δομή της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PDBID:7EST).

Το μόριο της PPE συνίσταται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 240 καταλοίπων (**Εικόμα 1.4**)<sup>24</sup>, με την ενεργό της περιοχή να έχει ερευνηθεί εκτενώς με υποστρώματα και αναστολείς κυμαινόμενης δομής και μήκους με τη χρήση ενζυμικών, NMR και κρυσταλλογραφικών μεθόδων. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι (i) η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος εκτείνεται σε περίπου 29 Å και αποτελείται από οκτώ υποπεριοχές, S<sub>5</sub> έως S<sub>3</sub>' των οποίων η εξειδίκευση έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια<sup>25</sup>, (ii) η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνει σημαντικά με το μήκος της αλυσίδας των υποστρωμάτων (για παράδειγμα, το N-succinyl-AAAA-pNA υδρολύεται 4x10<sup>4</sup> φορές ταχύτερα από ό,τι το N-succinyl-AA-pNA<sup>26</sup> (iii) Πολλαπλοί τρόποι πρόσδεσης υποστρωμάτων<sup>27</sup> και αναστολέων<sup>28,29</sup> είναι πιθανοί.

10	20	30	40	50
MLRLLVVASL	VLYGHSTQDF	PETNARVVGG	TEAQRNSWPS	QISLQYRSGS
60	70	80	90	100
SWAHTCGGTL	IRQNWVMTAA	HCV DREL TFR	VVVG EHN LNQ	NDGTEQYVGV
110	120	130	140	150
QKIVVHPYWN	TDDVAAGYDI	ALLRLAQSVT	LNSYVQLGVL	PRAGTILANN
160	170	180	190	200
SPCYITGWGL	TRTNGQLAQT	LQQAYLPTVD	YAICSSSSYW	GSTVKNSMVC
210	220	230	240	250
AGGDGVRSGC	QGDSGGPLHC	LVNGQYAVHG	VTSFVSRLGC	NVTRKPTVFT
260				
RVSAYISWIN	NVIASN			

**Εικόνα 1.4:** Αμινοξική αλληλουχία της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται τα καταλυτικά κατάλοιπα).

Θεωρείται ότι τα πεπτιδικά υποστρώματα συνδέονται με τις πλευρικές αλυσίδες τους σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης της ενεργού περιοχής (S και S' υποπεριοχές), αλλά και με άτομα του κυρίως σκελετού του πεπτιδίου (σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, υδρόβοφων δεσμών, κ.λ.π.), σχηματίζοντας ένα β-αντιπαράλληλο φύλλο με μια μικρή αλληλουχία στην ακυλ-ομάδα του ενζύμου (κατάλοιπα 214-216 και 222-224).

Η ελαστάση έχει ευρύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τα περισσότερα άλλα ένζυμα της οικογένειας αυτής, διασπώντας πεπτιδικούς δεσμούς μετά από κάθε μικρό λειψατικό αμινοξύ ακολουθώντας τον μηχανισμό που προτείνεται για όλες τις σερινοπρωτεϊνάσες<sup>30</sup>. Επιπλέον, κινητικές μελέτες για την παγκρεατική ελαστάση χοίρου χρησιμοποιώντας πεπτιδικά υποστρώματα μεταβαλλόμενου μήκους και συνθέσης δείχνουν ότι τουλάχιστον τέσσερα κατάλοιπα που προηγούνται της θέσεως διάσπασης (κατάλοιπα P) και δύο κατάλοιπα μετά από αυτή (κατάλοιπα P') είναι αναγκαία για βέλτιστη πρωτεόλυση. Η πλήρωση των S<sub>5</sub> και S<sub>4</sub> υποπεριοχών του ενζύμου, καθώς και η παρουσία προλίνης και βαλίνης στις θέσεις P<sub>2</sub> και P<sub>1</sub> του υποστρώματος αντίστοιχα είναι σημαντική για αποτελεσματική κατάλυση.

Κρυσταλλικές δομές ακτίνων X πολλών συμπλόκων αναστολέων-PPE έχουν επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία<sup>31-33</sup>, όπου διαφαίνεται ότι δεν υπάρχει κοινός τρόπος πρόσδεσης μεταξύ των μη ομοιοπολικών αναστολέων και μάλιστα για τον ίδιο τύπο αναστολέων βρέθηκε ότι προσδένονται με δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις<sup>34</sup>. Μία σημαντική κατηγορία ισχυρών αντιστρεπτών αναστολέων της παγκρεατικής ελαστάσης, με τιμές K<sub>i</sub> της τάξης των 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-8</sup> M, συνιστούν τα τριφθοροακετυλ-πεπτιδία-π-τριφθορο-ανιλινίδια<sup>35</sup>. Κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτίνων X του 1:1 συμπλόκου της PPE με τον αντιστρεπτό αναστολέα CF<sub>3</sub>C(O)-LA-NHPh-p-CF<sub>3</sub> (K<sub>i</sub> = 23.6 x10<sup>-9</sup> M) σε ανάλυση 1.8 Å, έδειξε το μόριο αναστολέα να είναι σφιχτά δεσμευμένο στην PPE με την τριφθοροακετυλ- ομάδα του αναστολέα να συνδέεται στην ενεργό περιοχή της PPE, ενώ οι δύο φθοριούχες ομάδες του αναστολέα εμφάνισαν διαφορετική εξειδίκευση<sup>36</sup>. Παρολαυτά, τρεις επιπρόσθετες κρυσταλλικές δομές τριφθοροακετυλ-πεπτιδίων-π-τριφθορο-ανιλινιδίων, οι οποίες λύθηκαν, ενισχύουν την υπόθεση ότι αυτού του τύπου οι αναστολείς προσδένονται με διαφορετικό τρόπο στην ελαστάση<sup>37</sup>.

Στο παρόν, ο μηχανισμός της αντιστρεπτής αναστολής της PPE διερευνήθηκε με βάση μια σειρά από κατάλληλους και χρήσιμους ανιχνευτές. Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν τρεις εξειδικευμένοι αντιστρεπτοί αναστολείς της PPE με γενική μορφή

$\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-XA-NHPH-p-CF}_3$ , όπου  $\text{X}=\{\text{D,K,V}\}$  και χρησιμοποιήθηκαν στις μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν, οι οποίες μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν: (α) προφίλ pH, απόλυτης θερμοκρασίας και εφαρμογή μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων για τις υπό μελέτη παραμέτρους, καθώς και υπολογισμό των σημαντικών σταθερών ταχύτητας και θερμοδυναμικών σταθερών, (β) υπολογιστικές αναλύσεις (χρήση τεχνικών μοριακής μοντελοποίησης όπως μοριακής πρόσδεσης και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής) και (γ) κινητική αναστολής. Να σημειωθεί ότι σ' όλες αυτές τις δοκιμασίες το Suc-AAA-pNA χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα. Τα συνδυασμένα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν ένα νέο μηχανισμό της αντιστρεπτής αναστολής της PPE, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να είναι χρήσιμο για τον μελλοντικό σχεδιασμό παραγώνων έναντι της παθογένεσης του εμφυσήματος και άλλων ασθενειών. Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί αιτία μόνιμης βλάβης, είτε θανάτου, λόγω παρεμπόδισης της ροής του αέρα που παρεμβαίνει στην κανονική αναπνοή. Το εμφύσημα συμβάλλει σημαντικά στην ΧΑΠ με διάφορους μηχανισμούς (π.χ. ανισορροπία Ελαστάσης-αναστολέων της). Με οξειδωση μίας μεθιονίνης μειώνεται η συγγένεια μεταξύ αναστολέων και Ελαστάσης, με αποτέλεσμα υψηλά ποσά της να αποικοδομούν συστατικά της πνευμονικής μήτρας μειώνοντας την αναπνευστική επιφάνεια.

## 1.2 Ασπαρτικοπρωτεϊνάσες

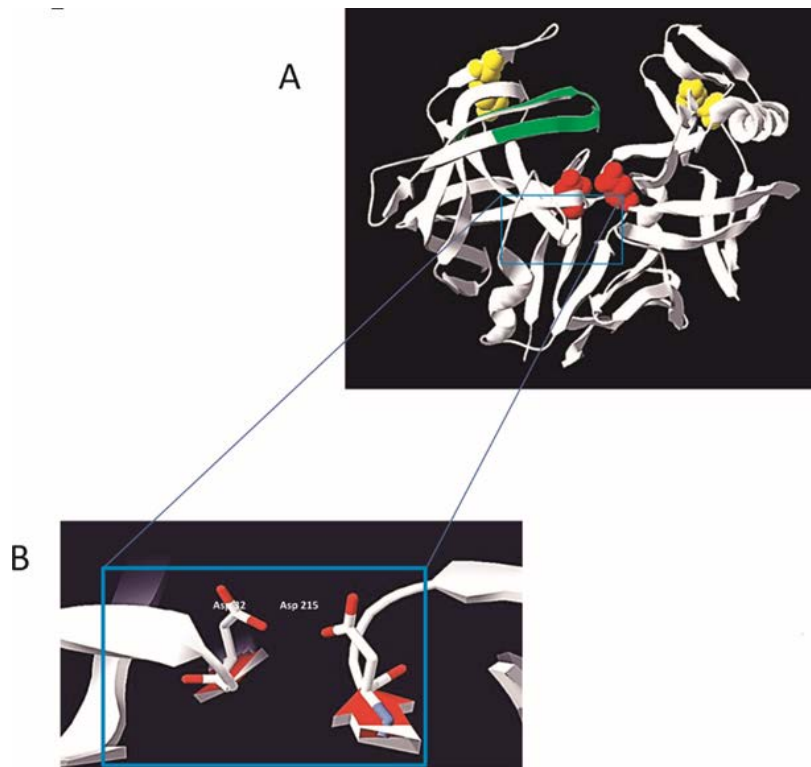
### 1.2.1 Εισαγωγή

Οι ασπαρτικοπρωτεϊνάσες (EC 3.4.23\_), γνωστές επίσης και ως όξινης-πρωτεϊνάσες ή ασπαρτυλ-πρωτεϊνάσες, είναι ενδοπεπτιδάσες με δύο κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος που είναι κρίσιμα για την καταλυτική τους δράση ( $\text{D}^{32}$  και  $\text{D}^{215}$ , αρίθμηση πεψίνης) στο ενεργό τους κέντρο. Αυτή η σχετικά μικρή ομάδα των ενζύμων έχει λάβει πολλή προσοχή από την επιστημονική κοινότητα, εξαιτίας του συσχετισμού τους με ανθρώπινες ασθένειες. Μερικές από αυτές τις πρωτεάσες περιλαμβάνουν τις πλασμίνες του παρασίτου *Plasmodium falciparum*, την HIV-1 πεπτιδάση στο σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) και τις εκκρινόμενες ασπαρτικοπρωτεϊνάσες σε μολύνσεις από το παράσιτο *Candida*<sup>38</sup>. Ασπαρτικοπρωτεϊνάσες από άλλες ζύμες και μύκητες έχουν επίσης μελετηθεί

εκτενώς, και αρκετές έχουν καθαριστεί και κλωνοποιηθεί για ερευνητικούς και βιομηχανικούς σκοπούς.

Οι ασπαρτικοπρωτεΐνάσες ομαδοποιούνται σε τρεις οικογένειες, της πεψίνης (A1), της ρετροπεψίνης (A2) και τα ένζυμα από παραρετροϊούς (A3). Η βάση δεδομένων Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) παρέχει έναν πλήρη κατάλογο όλων των αλληλουχιών που σχετίζονται με την οικογένεια των ασπαρτικοπρωτεΐνασών<sup>39</sup>.

Ανάλυση των διαφόρων ασπαρτικοπρωτεΐνασών με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δείχνει ότι ως επί το πλείστον αποτελούνται από δευτεροταγείς δομές  $\beta$ -κλώνων. Οι  $\beta$ -κλώνοι βρίσκονται στη βάση της σχισμής της ενεργού περιοχής και περιέχουν τα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού (**Εικόνα 1.5A-B**). Στην τριτοταγή δομή της πεψίνης χοίρου και της ενδοθειαπεψίνης, αυτά τα κατάλοιπα ασπαρτικού (D<sup>32</sup> και το D<sup>215</sup> της αλληλουχίας των ενζύμων αυτών<sup>40</sup>) βρίσκονται σε κάθε ένα από τους δύο σχεδόν συμμετρικούς λοβούς ( $\alpha/\beta$  μονομερή). Ένα μόριο νερού βρίσκεται να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις καρβοξυλομάδες των δύο καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού οξέος και πιστεύεται ότι συμμετέχει ενεργά στον καταλυτικό τους μηχανισμό<sup>41</sup>. Ενδιαφέρον είναι ότι οι δομές αυτές θεωρείται ότι συνίστανται από τους μεγαλύτερους  $\beta$ -κλώνους που παρατηρούνται σε σφαιρικές πρωτεΐνες<sup>42</sup>. Η πλειοψηφία των ασπαρτικοπρωτεΐνασών είναι επίσης γνωστό ότι έχουν τουλάχιστον ένα κάλυμα που αποτελείται από μια δομή  $\beta$ -φουρκέτας η οποία ολοκληρώνει την ενεργό περιοχή τους<sup>43</sup>. Η περιοχή αυτή η οποία και επισημαίνεται με πράσινο χρώμα στην **Εικόνα 1.5-A** καλύπτει το καταλυτικό κέντρο και συνιστά την σχισμή της ενεργού περιοχής, η οποία βρίσκεται να είναι κάθετη ως προς την μεγαλύτερη διάμετρο του μορίου και μπορεί να δεχθεί επτά ως οκτώ αμινοξικά κατάλοιπα, εξίσου διαμοιρασμένα και στις δύο πλευρές των καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού<sup>44</sup>. Τα “καλύματα” αυτά χρησιμεύουν ως μηχανισμός που κατά το κλείσιμο, βοηθούν ώστε το μόριο του ενζύμου να υιοθετήσει τη σωστή γεωμετρία και συγκρατούν το υπόστρωμα σε τέτοια θέση ώστε να εκκινήσει η καταλυτική διαδικασία.

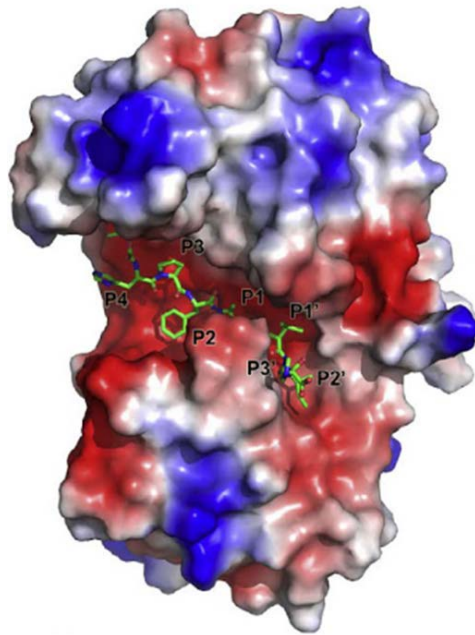


**Εικόνα 1.5:** Τρισδιάστατη δομή μιας τυπικής ασπαρτικοπρωτεΐνάσης (Accession number: 1j71): **A)** Αναπαράσταση των κύριων δομικών στοιχείων, όπου διακρίνονται η ενεργός περιοχή (με κόκκινο), οι δισουλφιδικοί δεσμοί (με κίτρινο) και το κάλυμα με δομή  $\beta$ -φουρκέτας (πράσινο χρώμα), **B)** Σχισμή ενεργού περιοχής και καταλυτικά κατάλοιπα.

Γενικά, οι περισσότερες μικροβιακές ασπαρτικοπρωτεΐνάσες εμφανίζουν ευρεία εξειδίκευση για πεπτιδικά υποστρώματα που περιέχουν έξι υδρόφοβα κατάλοιπα σε συγκεκριμένες θέσεις τους<sup>45</sup>.

### 1.2.2 Μηχανισμός δράσης των ασπαρτικοπρωτεϊνών

Η σχισμή στην οποία προσδένεται το υπόστρωμα των ασπαρτικοπρωτεϊνών έχει έκταση 7 ως 8 αμινοξέων (περίπου από την P<sub>5</sub> ως την P<sub>3'</sub> περιοχή - **Εικόνα 1.6**) και σχηματίζεται εκεί, όπου η N-τελική περιοχή και η C-τελική περιοχή συναντώνται.

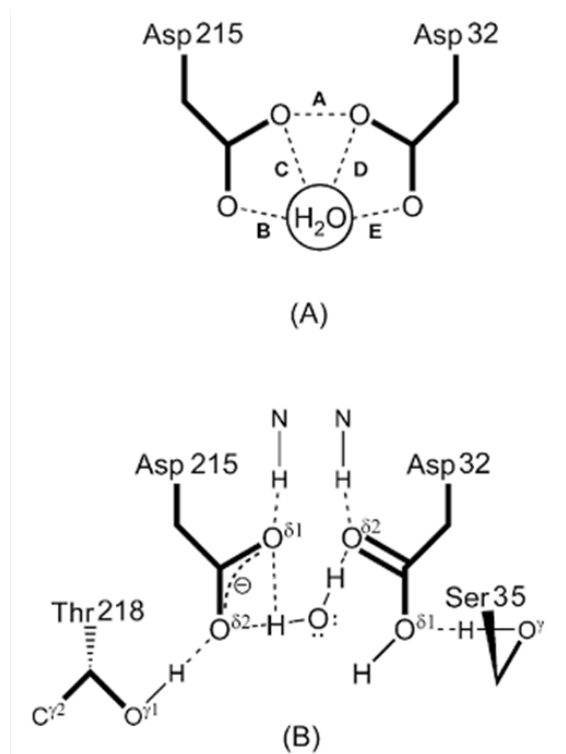


**Εικόνα 1.6:** Μια άποψη της σχισμής πρόσδεσης του υποστρώματος των ασπαρτικοπρωτεασών (PDB ID:1OEX<sup>44</sup>)

Τοποθετημένα, κεντρικά, σ' αυτή την σχισμή είναι και τα δύο καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (D<sup>32</sup> και D<sup>215</sup>), με τέτοιο τρόπο ώστε το καθένα από αυτά να περιβάλλεται από σχεδόν πανομοιότυπα μοτίβα υποστήριξης συνήθως το μοτίβο D-T/S-G-T/S, το οποίο είναι σημαντικό για την δημιουργία και την διατήρηση του κατάλληλου περιβάλλοντος για τις καρβοξυλομάδες. Οι σχισμές στις ρετροπεψίνες είναι ελαφρώς πιο μικρές και συνήθως διαθέτουν κατάλοιπα από την P<sub>8</sub> ως την P<sub>3</sub> περιοχή<sup>46</sup>.

Κατά την υπάρχουσα βιβλιογραφία οι καρβοξυλομάδες των δύο καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού, καθώς και το μόριο H<sub>2</sub>O το οποίο είναι συνδεδεμένο μεταξύ τους, βρίσκονται κατά προσέγγιση, στο ίδιο νοητό επίπεδο. Η απόσταση μεταξύ των δύο εσωτερικών ατόμων οξυγόνου των καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού (**Σχήμα 1.5A**) είναι μεγαλύτερη ή ίση με το άθροισμα των ακτίνων van der Waals (2 x 1.4 Å). Αυτό δεν υποδηλώνει απαραίτητα την ύπαρξη δεσμού υδρογόνου μεταξύ των δύο καταλυτικών ασπαρτικών. Οι αποστάσεις B και C (**Σχήμα 1.5A**) είναι περίπου ίσες υποδηλώνοντας ότι ένα από τα πρωτόνια του μορίου του H<sub>2</sub>O είναι τοποθετημένο στη μέση της απόστασης μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου σε ένα διχαλωτό δεσμό υδρογόνου. Οι αποστάσεις D και E (**Σχήμα 1.5A**) διαφέρουν κατά 0.45 Å και ταιριάζουν με ένα πρωτόνιο στο εξωτερικό οξυγόνο του D<sup>32</sup> και ενός

δεσμού υδρογόνου μεταξύ του δεύτερου πρωτονίου του  $\text{H}_2\text{O}$  με το εσωτερικό οξυγόνο του  $\text{D}^{32}$  (απόσταση  $\text{O}\cdots\text{O} = 2.76 \text{ \AA}$ ).

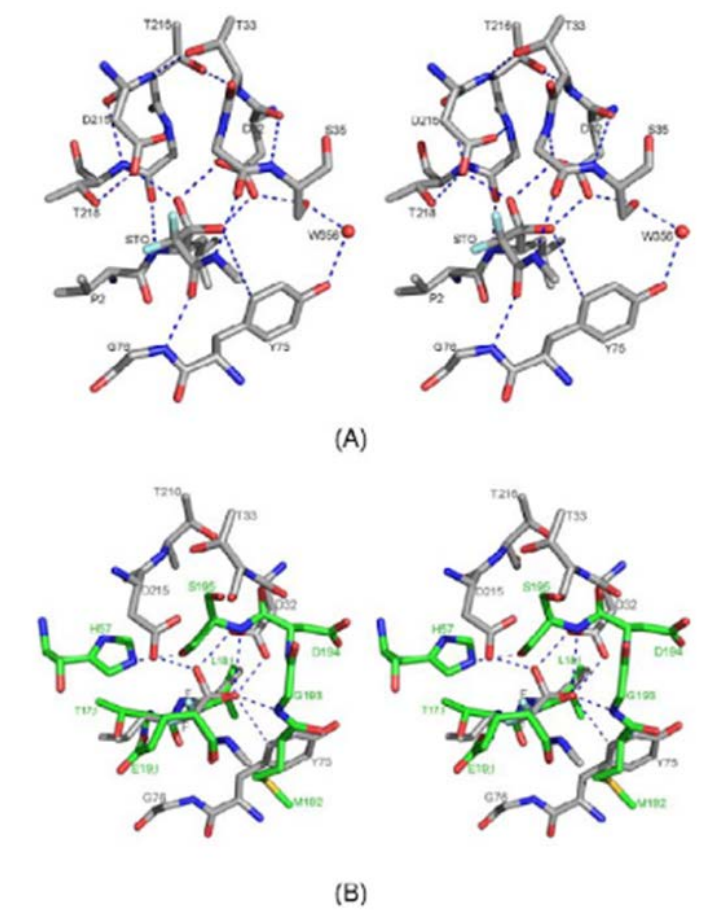


**Σχήμα 1.5:** Σχηματικό διάγραμμα του καταλυτικού κέντρου των ασπαρτικοπρωτεϊνών όπου **(A)** καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και πιθανοί υδρογονοδεσμοί με το καταλυτικό μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  και **(B)** Επαφές καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού οξέος.

Η πιο απλή ερμηνεία αυτών των αποστάσεων δεσμών υδρογόνου δίνεται στο **Σχήμα 1.5B**. Σ' αυτή την ερμηνεία του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου, στην θεμελιώδη κατάσταση, το κατάλοιπο  $\text{D}^{215}$  θα έπρεπε να ήταν αρνητικά φορτισμένο και το  $\text{D}^{32}$  θα έπρεπε να ήταν ένα ουδέτερο καρβοξυλικό οξύ. Δύο τιμές  $pK_a$  (περίπου 1.5 και 4.5, αντίστοιχα) υπολογίζονται λόγω του ιονισμού των καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου. Η πρωτονιακή κατανομή που φαίνεται στο **Σχήμα 1.5B** ταιριάζει καλά με τεκμηριωμένα πειραματικά αποτελέσματα<sup>47-49</sup>.

Ο ενζυμικός μηχανισμός των σερινοπρωτεϊνών είναι ο πιο καλά διεκρινισμένος και θα μπορούσε να αποτελέσει σημείο για σύγκριση με τον μηχανισμό των ασπαρτικοπρωτεϊνών. Σε ένα μεγάλο αριθμό δομών σερινοπρωτεϊνών, τα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα μπορούν να προσομοιώσουν τα σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος πριν την υδρόλυση των πεπτιδικών υποστρωμάτων από τις σερινοπρωτεϊνάσες<sup>50</sup>. Η σύγκριση των συμπλόκων

σερινοπρωτεϊνάσων-πρωτεϊνικού αναστολέα (π.χ. το σύμπλοκο  $\alpha$ -χυμοθρυψίνη-ΟΜΤΚΥ3) με το τετραεδρικό ενδιάμεσο, που μιμείται την υδρολυτική αντίδραση των ασπαρτικοπρωτεϊνάσων<sup>51</sup>, είναι αποκαλυπτική (**Εικόνα 1.7**).



**Εικόνα 1.7:** Στερεοσκοπικές απεικονήσεις: **(Α)** δομή του αναστολέα Isovaleryl-valyl-valyl-difluorostatone methylester δεσμευμένου στο καταλυτικό κέντρο της πενικιλοπτεψίνης και **(Β)** υπέρθεση αυτής της δομής και του ΟΜΤΚΥ3 προσδεδμεμένου στο καταλυτικό κέντρο της  $\alpha$ -χυμοθρυψίνης.

Ο σχηματισμός του τετραεδρικού ενδιάμεσου και στις σερινοπρωτεϊνάσες και στις ασπαρτικοπρωτεϊνάσες προκύπτει από πυρηνόφιλη προσβολή επάνω στον καρβονυλικό άνθρακα του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού. Το πυρηνόφιλο στις ασπαρτικοπρωτεϊνάσες είναι το μόριο του  $\text{H}_2\text{O}$  που είναι προσδεδμένο μεταξύ των δυο καρβοξυλομάδων των  $\text{D}^{32}$  και  $\text{D}^{215}$  (**Σχήμα 1.5**) και ενεργοποιείται προς ανιόν υδροξυλίου από την γενική βάση (το καρβοξύλιο του  $\text{D}^{215}$ ). Στις σερινοπρωτεϊνάσες το πυρηνόφιλο είναι το άτομο  $\text{O}_\gamma$  της καταλυτικής  $\text{S}^{195}$  και η γενική βάση το ιμιδαζόλιο της καταλυτικής  $\text{H}^{57}$ .



Το ηλεκτρονιόφιλο στοιχείο, που βοηθάει στην πυρηνόφιλη προσβολή του ατόμου **O<sub>γ</sub>** της καταλυτικής **S<sup>195</sup>**, είναι η σπή οξανιόντος. Αυτό το χαρακτηριστικό στις σερινοπρωτεΐνάσες σχηματίζεται από δυο -NH ομάδες του πρωτεϊνικού σκελετού (**S<sup>195</sup>** και **G<sup>193</sup>**), οι οποίες σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το άτομο του καρβονυλικού οξυγόνου του **P<sub>1</sub>** καταλοίπου του υπό υδρόλυση δεσμού. Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει την πόλωση της καρβοξυλομάδας και αυξάνει τον ηλεκτροθετικό χαρακτήρα του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα βοηθώντας έτσι στη μεταφορά πρωτονίου από το άτομο **O<sub>γ</sub>** της καταλυτικής **S<sup>195</sup>** στο άτομο **N<sub>ε2</sub>** της καταλυτικής H<sup>57</sup>, μειώνοντας την τιμή της pK<sub>a</sub> της **S<sup>195</sup>**. Το ανάλογο χαρακτηριστικό στις ασπαρτικοπρωτεΐνάσες συνίσταται από δύο στοιχεία: (1) την πρωτονιωμένη καρβοξυλομάδα του καταλυτικού D<sup>32</sup> που σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό άτομο οξυγόνου του υποστρώματος στο σύμπλοκο E-S και (2) μια ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του φαινολικού υδροξυλίου της Y<sup>75</sup> με το καρβοξυλικό οξυγόνο του υποστρώματος (του υπό υδρόλυση δεσμού)<sup>52,53</sup>. Αυτή η τελευταία αλληλεπίδραση είναι μάλλον πιθανή και όχι αποδεδειγμένη, αλλά μπορεί να υποστηριχθεί λόγω της άμεσης συνεισφοράς της στην καταλυτική δράση του ενζύμου, όπως προέκυψε από πειράματα μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης όπου αντικαταστάθηκε με 17 άλλα αμινοξέα στην πεψίνη από το *Rhizomucor pusillus*<sup>54</sup>.

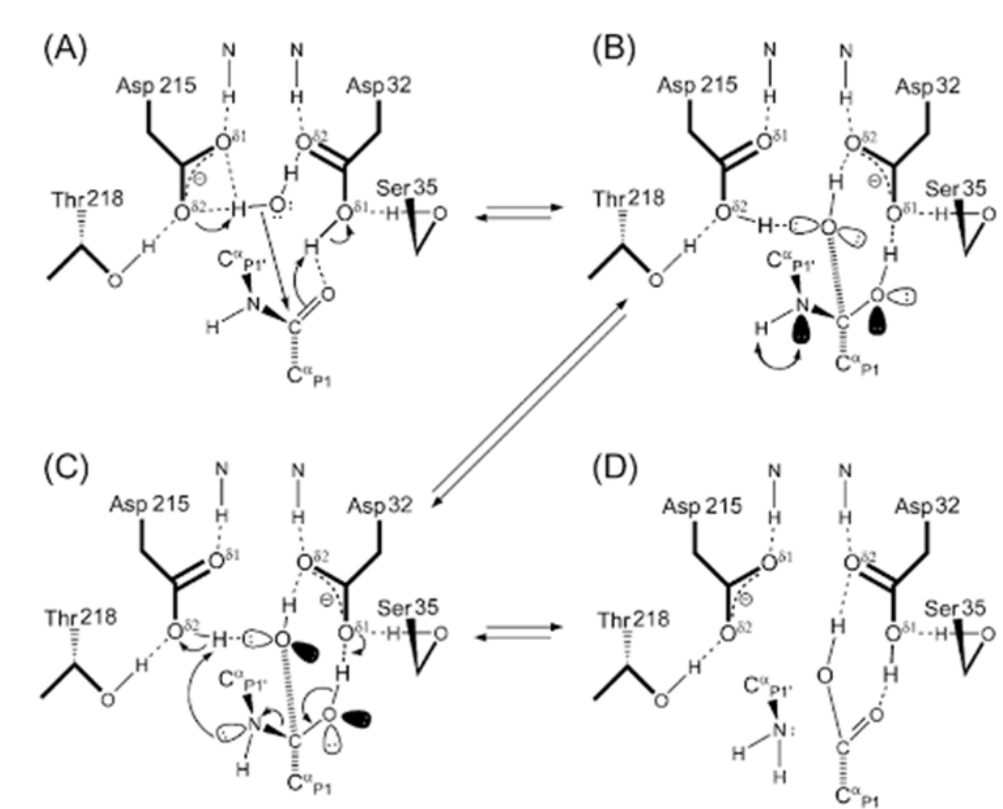
Ακολουθώντας την πυρηνόφιλη προσβολή του υπό υδρόλυση πεπτιδίου από την γενική βάση του ενεργοποιημένου υδροξυλίου (του μορίου του καταλυτικού H<sub>2</sub>O), το προκύπτον τετραεδρικό ενδιάμεσο υιοθετεί μία δίδυμη αλληλεπίδραση δεσμών υδρογόνου με την αρνητικά φορτισμένη, τώρα, καρβοξυλομάδα του D<sup>32</sup> (**Σχήμα 1.6-B**). Διαφορετικές έρευνες σε κρυσταλλικές δομές πενικιλοπεψίνης και ενδοθειαπεψίνης, σε σύμπλοκα με ενυδατωμένες διφθοροκετόνες, έχουν επιβεβαιώσει την πιθανότητα μιας τέτοιας δίδυμης διόλης για το τετραεδρικό ενδιάμεσο.

Σε αυτό το στάδιο, ο μηχανισμός υδρόλυσης του πεπτιδικού δεσμού απαιτεί πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας του αζώτου. Αναφερόμενοι στην υδρολυτική πορεία του **Σχήματος 1.6-B** φαίνεται ότι εφαρμογή στερεοηλεκτρονικών φαινομένων έχει ως αποτέλεσμα την επίδραση στο μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου του υπό υδρόλυση δεσμού και την απομάκρυνσή του από το καταλυτικό D<sup>215</sup>. Για να πραγματοποιηθεί μια πρωτονιακή μεταφορά, το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου του υπό υδρόλυση δεσμού θα πρέπει να

τοποθετηθεί προς την πλευρά της πρωτονιωμένης καρβοξυλομάδας του  $D^{215}$ . Αυτό μπορεί να λάβει χώρα με αντιστροφή της απόλυτης διαμόρφωσης του ατόμου του αζώτου, μια διαδικασία εξαιρετικά γρήγορη<sup>55</sup>.

Η μεταφορά του πρωτονίου της αποχωρούσας ομάδας του αζώτου (**Σχήμα 1.6-C**) συνδέεται στενά με τον επανασχηματισμό της πρωτονιακής κατάστασης του καρβοξυλίου του  $D^{32}$ . Αυτός ο τελευταίος επανασχηματισμός συνδέεται στενά, επίσης, με την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού με συντονισμένη διαδικασία μεταφοράς πρωτονίων και εκ νέου διευθέτησης των βαρέων ατόμων και με αποτέλεσμα το πρωτονιωμένο καρβονυλικό οξυγόνο να μεταφέρει το πρωτόνιο στην καρβοξυλομάδα του  $D^{32}$ . Δηλαδή, το καρβονύλιο του νεοσχηματισθέντος καρβοξυλίου δημιουργείται ταυτόχρονα με την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού, η οποία θα πρέπει να συμβαίνει (και συμβαίνει) ταυτόχρονα με την πρωτονίωση του ατόμου του αζώτου (του υπό υδρόλυση δεσμού).

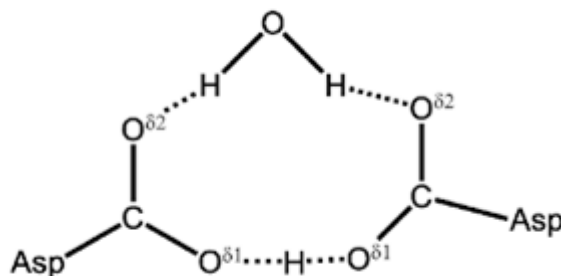
Σε πολλές κρυσταλλικές δομές ενδιάμεσων μεταβατικής κατάστασης των ενζύμων πενικιλοπεψίνη και ενδοθειαπεψίνη υπάρχουν δεσμοί υδρογόνου χαμηλού φράγματος (LBHB) μεταξύ του εξωτερικού καρβοξυλικού οξυγόνου του  $D^{32}$  και του ατόμου οξυγόνου μιας ομάδας φωσφωνικού. Αυτός ο δεσμός είναι μικρός σε μήκος (2.42 - 2.54 Å) και θα πρέπει να αξιολογηθεί ως υψηλής ενέργειας (LBHB). Η απελευθέρωση ενέργειας από αυτόν τον δεσμό υδρογόνου θα πρέπει να βοηθάει στην υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού, χαμηλώνοντας το φράγμα της ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης, επαναφέροντας το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου στην αρχική του κατάσταση. Είναι πιθανό ότι ένας τέτοιος ισοδύναμος δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος, μεταξύ ανάλογων ατόμων οξυγόνου, να υπάρχει στην μεταβατική κατάσταση της υδρολυτικής πορείας ενός “καλού” υποστρώματος. Ένας τέτοιος δεσμός θα έχει μια ισχυρή επίδραση στις δύο μεταφορές πρωτονίου που απαιτούνται κατά την αντίδραση διάσπασης του δεσμού (**Σχήμα 1.6-C,D**). Καθώς το πρωτόνιο του δεσμού με χαρακτηριστικά LBHB συνδέεται περισσότερο με το  $D^{32}$ , η ενέργεια του θα χρησιμοποιηθεί για να διευκολυνθεί η μεταφορά πρωτονίου από το  $D^{215}$  στην αποχωρούσα ομάδα του αζώτου μαζί με την μείωση του φράγματος της ενέργειας ενεργοποίησης για την διάσπαση του δεσμού. Επισημαίνεται ότι ο προαναφερόμενος δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος (LBHB) υπάρχει στην μεταβατική κατάσταση, όπως και σε τούτο τον μηχανισμό (όπως έχει προταθεί και από τον Cleland)<sup>56</sup>.



**Σχήμα 1.6A-D:** (A) αναπαράσταση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, (B) Τετραεδρικό ενδιάμεσο, (Γ) μοντέλο για πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας, (Δ) η διάσπαση του δεσμού.

Ο δεσμός (LBHB) που συζητήθηκε αμέσως παραπάνω είναι διαφορετικός από τον πιθανό LBHB μεταξύ των καρβοξυλομάδων του D<sup>32</sup> και του D<sup>215</sup>, στον οποίο αναφερθήκαμε πιο πριν για να εξηγηθεί ο κινητικός μηχανισμός των ασπαρτικοπρωτεϊνών. Το επιχείρημα αυτό στηρίζεται σε μια κυκλική δομή δέκα ατόμων συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου, που συμπεριλαμβάνει και το μόριο του καταλυτικού H<sub>2</sub>O, αλλά και τις δύο καρβοξυλομάδες του καταλυτικού κέντρου (**Σχήμα 1.7**) και που κυρίως βασίστηκε σε *ab initio* προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, στην πρωτεάση HIV-1<sup>57</sup>. Ένας δεσμός υδρογόνου, με χαρακτηριστικά LBHB, μεταξύ των δύο καταλυτικών ασπαρτικών απαιτεί απόσταση μεταξύ των δύο εσωτερικών τους οξυγόνων μικρότερη από 2.5 Å. Αναλύοντας τα μέχρι στιγμής δεδομένα, δεν υπάρχει καμία περίπτωση στην οποία μια τέτοια απόσταση (A) να είναι μικρότερη από 2.76 Å, συνεπώς αυτή αντιπροσωπεύει μια κανονική επαφή οξυγόνου-οξυγόνου. Επιπροσθέτως και όσον αφορά τον LBHB, αυτός για να είναι αποτελεσματικός και να χαμηλώνει το ενεργειακό φράγμα της καταλυόμενης αντίδρασης, δεν θα πρέπει να λαμβάνει χώρα στη θεμελιώδη κατάσταση αλλά θα

πρέπει να σχηματίζεται στη μεταβατική κατάσταση ή σε ένα μεταβατικό ενδιάμεσο κάτι το οποίο δεν προκύπτει σε καμία από τις δομές που προσομοιάζουν σε μεταβατικές καταστάσεις.



**Σχήμα 1.7:** Προτεινόμενη αναπαράσταση/απεικόνιση από *ab initio* προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των δύο καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού οξέος και του καταλυτικού μορίου H<sub>2</sub>O στην πεπτιδάση HIV-1.

Τελικά, μελέτες με ακτίνες-Χ και περίθλαση νετρονίων της ενδοθειαπεψίνης σε σύμπλοκο της με αναστολέα ανάλογο μεταβατικής κατάστασης βοήθησαν στον προσδιορισμό, με σχετικά μεγάλη ακρίβεια, των πρωτονιακών καταστάσεων των ομάδων του καταλυτικού κέντρου<sup>58</sup>. Το D<sup>32</sup> φαίνεται ως ιονισμένο και αρνητικά φορτισμένο ενώ το D<sup>215</sup> είναι πρωτονιωμένο. Αυτή η κατανομή φορτίου ανταποκρίνεται ακριβώς με αυτήν του χημικού μηχανισμού που προέκυψε ως συμπέρασμα από πολλές κρυσταλλογραφικές δομές και παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.6-B,C**. Ο προσδιορισμός της δομής νετρονίων δεν δείχνει ύπαρξη κάποιου πρωτονίου μεταξύ των εσωτερικών ατόμων οξυγόνου των D<sup>32</sup> και D<sup>215</sup>. Η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων είναι 2.93 Å, επιβεβαιώνοντας πάλι ότι δεν υπάρχει δεσμός υδρογόνου με χαρακτήρα LBHB μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων ασπαρτικού.

Η πλειονότητα των λεπτομερειών, όσον αφορά τον μηχανισμό υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών από την οικογένεια των ασπαρτικοπρωτεϊνών έχουν προκύψει κυρίως από δομικές μελέτες αυτών των ενζύμων κι έτσι πληροφορίες σχετικές με το που βρίσκονται πρωτόνια δεν μπορούν να εξαχθούν με ασφάλεια<sup>52, 59-60</sup>. Παρολαυτά, οι αποστάσεις δότη-δέκτη συμφωνούν με τον μηχανισμό του **Σχήματος 1.7**, όπου το ιόν υδροξυλίου είναι το πυρηνόφιλο και ο σχηματισμός του διευκολύνεται από το D<sup>215</sup>, το οποίο δρα ως γενική βάση. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο που προκύπτει από την πυρηνόφιλη προσβολή στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα σταθεροποιείται από δεσμό υδρογόνου δίδυμης διόλης στο καταλυτικό D<sup>32</sup>. Ένας από αυτούς τους δεσμούς υδρογόνου έχει χαρακτηριστικά LBHB και του οποίου η ενέργεια μπορεί να

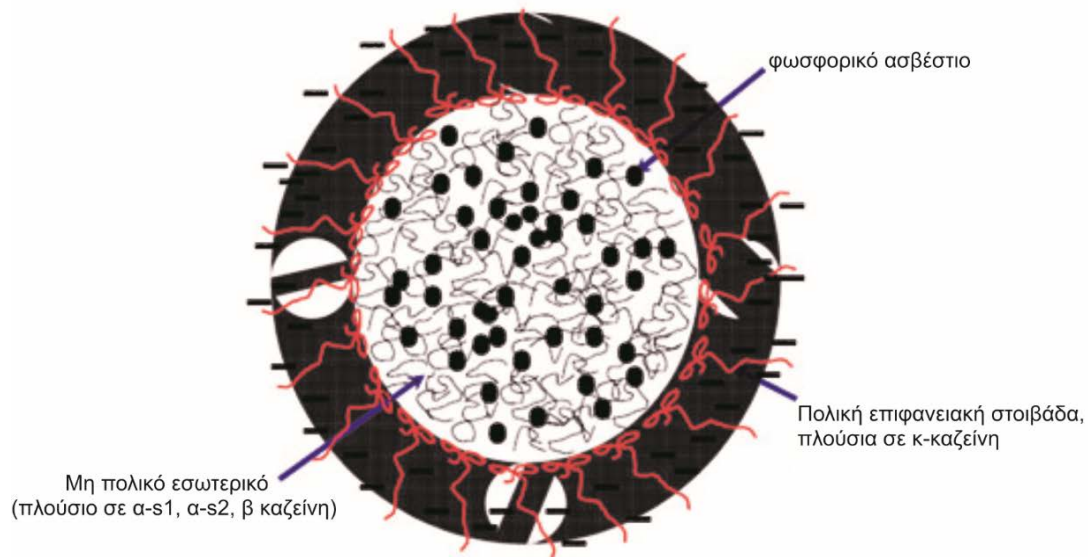
χρησιμοποιηθεί για να χαμηλώσει την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού. Η αποχωρούσα ομάδα του αζώτου, είναι πρωτονιωμένη από το πρωτονιωμένο  $D^{215}$ , το οποίο δρα ως γενικό οξύ.

### 1.2.3 Ασπαρτικοπρωτεΐνάσες στην παραγωγή τυριού και δράση του ενζύμου ρεννίνη επί της πήξης του γάλακτος

Με τον όρο πήξη του γάλακτος εννοούμε μια σειρά αλλαγών στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες υπό ορισμένες συνθήκες, προκαλούν μεταβολές στα μικύλια των καζεΐνών του και οδηγούν τελικά στη δημιουργία του τυροπήγματος. Οι αλλαγές αυτές είναι δυνατόν να προκληθούν είτε με οξίνιση είτε με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων που περιέχονται στην πυτιά<sup>61</sup>.

Η πυτιά ζώων (βόεια χυμοσίνη) χρησιμοποιείται συμβατικά ως παράγοντας πήξης του γάλακτος σε βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων για την παραγωγή τυριών υψηλής ποιότητας με καλή γεύση και υφή. Η ρεννίνη βρίσκεται σε αφθονία στο επιθήλιο των ηνύστρων, με τη μορφή του προενζύμου της προ-ρεννίνης και θεωρείται ότι είναι το μοναδικό ένζυμο που πρακτικά υπάρχει στο ήνυστρο αμέσως μετά τη γέννηση των ζώων. Η ρεννίνη απαντάται κυρίως σε τρεις μορφές: Α, Β και C, με τη ρεννίνη Β να βρίσκεται σε αφθονία. Η ρεννίνη Α διαφέρει ως προς την ρεννίνη Β σε ένα αμινοξύ στη θέση 243 (η ρεννίνη Α έχει D, ενώ η ρεννίνη Β έχει G), ενώ η ρεννίνη C αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης της ρεννίνης Α, έχοντας τρία κατάλοιπα λιγότερα  $D^{244}$ - $F^{246}$ . Η μοριακή της μάζα είναι περίπου 36 kDa, έχει ισοηλεκτρικό σημείο σε τιμή pH 4.5 κι έχει εκλεκτική υδρολυτική δράση επί της κ-καζεΐνης, γεγονός που την καθιστά σημαντική για την τυροκομία<sup>61-62</sup>.

Η καζεΐνη είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη του γάλακτος η οποία αποτελείται από 4 κλάσματα  $\alpha_s$  καζεΐνες ( $\alpha_{s1}$   $\alpha_{s2}$ ),  $\beta$ -καζεΐνη,  $\gamma$ -καζεΐνη και  $\kappa$ -καζεΐνη, καθένα από τα οποία παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές<sup>63-64</sup>. Σχεδόν ολόκληρο το ποσοστό της καζεΐνης του γάλακτος βρίσκεται υπό μορφή καζεϊνικών μικκυλίων (σφαιρικών συμπαγών διαμορφώσεων) μέσης διαμέτρου 40 – 300 nm, που συνίστανται από περίπου 10.000 μόρια καζεΐνης (**Εικόνα 1.8**).



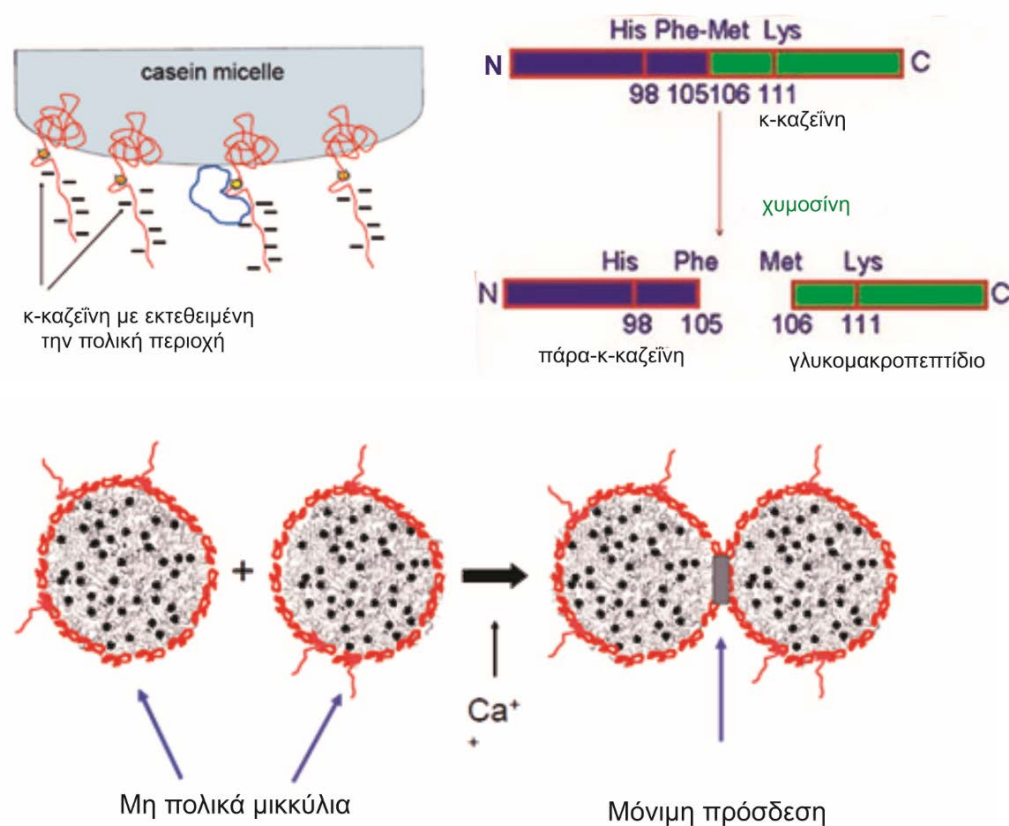
**Εικόνα 1.8:** Αναπαράσταση καζεϊνικού μικκυλίου

Τα καζεϊνικά μικκύλια περιέχουν επίσης ανόργανα συστατικά (κυρίως φωσφορικό ασβέστιο 8g/100g καζεΐνης), μικρές ποσότητες από άλλες πρωτεΐνες (πρωτεόζη, πεπτόνη) και άλλα ένζυμα. Τα μικκύλια είναι ογκώδη, έχουν μεγάλη ικανότητα συγκράτησης υγρασίας και είναι αρνητικά φορτισμένα. Στην επιφάνεια του μικκυλίου βρίσκονται τριχοειδείς προεκτάσεις (πάχους 5 nm) τα οποία αποτελούνται από ενυδατωμένα πολυπεπτίδια (caseinomacropепptide CMP), τα οποία βοηθούν στη σταθεροποίηση τους<sup>65</sup>.

Αποσταθεροποίηση και συσσωμάτωση των μικκυλίων λαμβάνει χώρα στις περιπτώσεις όπου οι τριχώδεις απολήξεις απομακρύνονται (π.χ. ενζυμικά), ή καταρρέουν, όπως και στις περιπτώσεις όπου τμήματα της επιφάνειας των καζεϊνικών μικκυλίων αποκτήσουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο. Οι παραπάνω επιδράσεις μπορεί να συμβούν σε μία σειρά από φυσικοχημικά φαινόμενα όπως είναι: η πάχυνση λόγω γήρανσης, η απόδραση και η ενσωμάτωση αέρα, η θερμική κατεργασία, η οξίνιση (τεχνητά ή βιοχημικά), η κατεργασία με ρεννίνη κ.α.<sup>66</sup>.

Με την επίδραση ρεννίνης τα νημάτια απελευθερώνονται στον ορό του γάλακτος και τα μικκύλια συσσωματώνονται δημιουργώντας πηκτές<sup>62</sup>. Η ενζυμική πήξη του γάλακτος η οποία οφείλεται στη δράση ασπαρτικοπρωτεϊνάσων ρεννίνης ή χυμοσίνης επί της κ-καζεΐνης και πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η κ-καζεΐνη των μικκυλίων δέχεται την πρωτεολυτική δράση της ρεννίνης η οποία υδρολύει την κ-καζεΐνη στη θέση F<sup>105</sup>-M<sup>106</sup>, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο πεπτιδίων με διαφορετικές ιδιότητες, το καζεϊνομακροπεπτίδιο (CMP) και την

παρα-κ-καζεΐνη (**Εικόνα 1.9**). Η παρα κ-καζεΐνη είναι υδρόφοβη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεϊνικές ουσίες είναι διαλυτές. Η προοδευτική υδρόλυση της κ-καζεΐνης κατά το πρώτο στάδιο, οδηγεί σε μεταβολή των ιδιοτήτων των μικκυλίων, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να συσσωματωθούν. Η φάση της συσσωμάτωσης αποτελεί το δεύτερο στάδιο της πήξης του γάλακτος, το μη ενζυμικό, όπου σχηματίζεται πήγμα ύστερα από σχηματισμό δεσμού φωσφόρου ασβεστίου μεταξύ των αποσταθεροποιημένων μικκυλίων καζεΐνης και των ιόντων ασβεστίου στο γάλα (**Εικόνα 1.9**). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πλέγμα παρα-καζεϊνικών σωματιδίων στα διάκενα των οποίων περιλαμβάνονται λιποσφαιρίδια και ορός γάλακτος<sup>61</sup>.



**Εικόνα 1.9:** Στάδια ενζυμικής πήξης γάλακτος όπου α) υδρόλυση της κ-καζεΐνης στη θέση F<sup>105</sup>-M<sup>106</sup> και β) συσσωμάτωση των μικκυλίων καζεΐνης

### 1.2.4 Πρωτεάσες από *Mucor sp* ως εναλλακτική πηγή ρεννίνης

Το γεγονός της αύξησης της ζήτησης πτυιάς για παραγωγή τυριού, παγκόσμια, σε συνδυασμό με την μειωμένη παραγωγή πτυιάς μόσχου, οδήγησε την έρευνα σε αναζήτηση για υποκατάστατα πτυιάς, κυρίως μικροβιακής προέλευσης. Οι μικροβιακές ασπαρατικοπρωτεΐνάσες και κυρίως αυτές που προέρχονται από μύκητες (Πίνακας 1.1) έχουν αντικαταστήσει τη χυμοσίνη βοοειδών, σε περισσότερο από το 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυριού, με μικροβιακές “πυτιές”. μεταξύ των οποίων είναι αυτές που παράγονται από τους *Rhizomucor miehei* και *Rhizomucor pusillus*, κερδίζοντας ευρεία βιομηχανική αποδοχή ως υποκατάστατα της βοοειδούς χυμοσίνης<sup>67</sup>. Τα δύο αυτά ένζυμα έχουν ίδια δραστηριότητα πήξης γάλακτος, όπως η χυμοσίνη βοοειδών και πλεονεκτούν έναντι των άλλων παρασκευασμάτων πτυιάς που προέρχονται από μύκητες διότι παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό τριτοταγούς πρωτεολυτικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού.

Πίνακας 1.1: Μικροβιακές ασπαρατικοπρωτεΐνάσες με ικανότητα πήξης γάλακτος

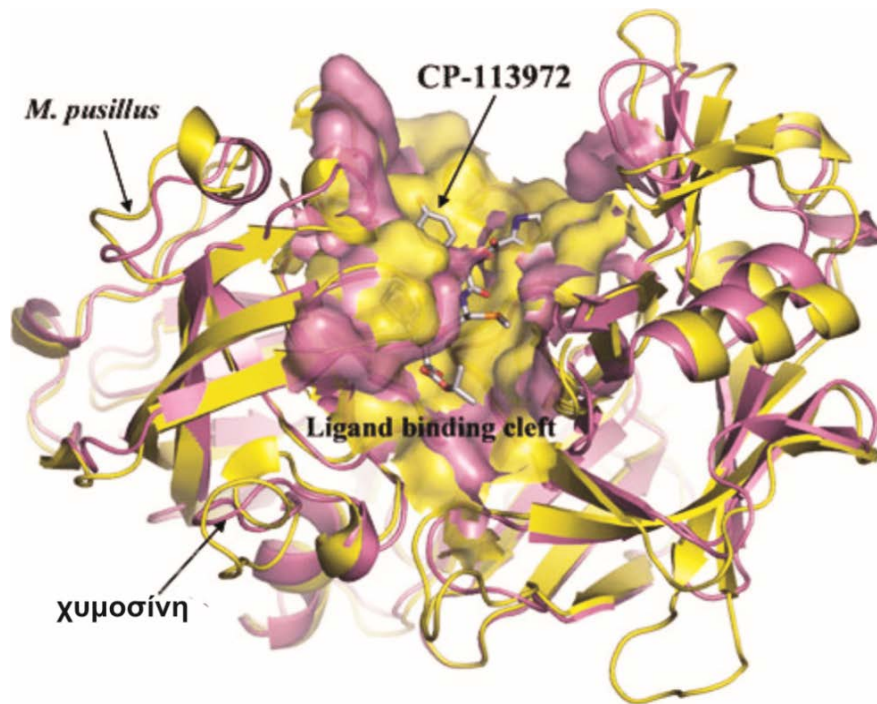
Μύκητες	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστη θερμοκρασία (°C)	Βέλτιστη τιμή pH	pI
<i>Rhizomucor pusillus</i> *	38.5	55	5.6	3.9
<i>Rhizomucor miehei</i>	20-43	58-62	5.6	4.1
<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	3.0-3.5	-
<i>Mucor renninus</i>	35	-	3.5	5.1
<i>Mucor varians</i> <i>Pispek</i>	-	-	3.0	-
<i>Mucor rouxii</i>	16	50	4.0	-
<i>Mucor bacilliformis</i>	32-35	45	3.0-3.5	5.2
<i>Mucor circinelloides</i>	33	-	3.0-3.5	4.2
<i>Rhizopus oryzae</i>	34	60	5.5	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	47	55	3.2	-
<i>Endothia parasitica</i>	34-39	-	4.5	5.5
<i>Penicillium duponti</i>	41	55	2.5	3.9

\*Το *Rhizomucor pusillus* (Lindt) είναι συνώνυμο του *Mucor pusillus* (Lindt)



Τα ένζυμα που παράγονται από τα *R. pusillus* (MPR) και *R. miehei* έχουν 83% ομοιότητα στην αλληλουχία και εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες αφού τα δύο αυτά είδη είναι ταξινομικά πολύ κοντά το ένα με το άλλο<sup>68-71</sup>. Όπως, τα άλλα μέλη της οικογένειας A1, το ένζυμο παράγεται ως ζυμογόνο με ένα προπεπτιδίο 44 αμινοξέων στο ένζυμο *R. pusillus* και 47 αμινοξέων στο *R. miehei*. Τρεις και δύο πιθανές θέσεις γλυκοζιλίωσης βρίσκονται στις αμινοξικές ακολουθίες των πρωτεασών από *R. pusillus* (N<sup>79</sup>, N<sup>113</sup>, N<sup>188</sup>) και *R. miehei* (N<sup>79</sup> και N<sup>188</sup>), αντίστοιχα. Η πρώτη τρισδιάστατη δομή της mucogrepsin προσδιορίστηκε από κρυσταλλογραφική ανάλυση του ενζύμου *R. pusillus*. Αργότερα, προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές του ενζύμου *R. miehei* και του συμπλόκου του με τον αναστολέα πεπστατίνη A.

Παρόλο που οι ενζυμικές ιδιότητες της πεψίνης από τον μύκητα *Rhizomucor* είναι όμοιες με αυτές της χυμοσίνης<sup>72</sup>, η υπερέθεση των ατόμων C<sub>α</sub> του σκελετού της MPR και της χυμοσίνης (PDB ID: 1CZI)<sup>73</sup>, με τον αναστολέα CP-113972 να διατηρείται μέσα στο ενεργό κέντρο της χυμοσίνης, υποδεικνύει σημαντικές διαφορές κυρίως στις περιοχές δέσμευσης του υποστρώματος. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.10**, η ενεργός περιοχή της MPR σχεδόν ταυτίζεται με εκείνη της χυμοσίνης, όπου ο αναστολέας CP- 113,972 δεσμεύεται. Ωστόσο, η υπέρθεση αυτή αποκαλύπτει ότι η σχισμή πρόσδεσης του υποστρώματος της MPR είναι διαφορετική από εκείνη που παρατηρείται στην χυμοσίνη, ειδικά γύρω από τη φαινολική και πυρρολική ομάδα του CP-113,972. Η σχισμή της ενεργού περιοχής προφανώς και σχηματίζεται από β-κλώνους, που περιέχουν τα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού (D<sup>32</sup> και D<sup>215</sup> στην περιοχή S<sub>1</sub>) συντηρημένη σε όλα τα ένζυμα της οικογένειας της πεψίνης<sup>74</sup>, αλλά παρουσιάζονται υποκαταστάσεις καταλοίπων που εντοπίζονται στις υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub> και P<sub>1</sub>, μεταβάλλοντας έτσι την εξειδίκευση υποστρώματος της MPR.



**Εικόνα 1.10:** Υπέρεθεση της δομής της MPR με αυτή της χυμοσίνης με τον αναστολέα CP-113972, για τον προσδιορισμό των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος.

Παρά το γεγονός ότι πολλά πεπτιδικά υποστρώματα με διαφορές στο μήκος και στην σύσταση έχουν συντεθεί για τη μελέτη της εξειδίκευσης τους, αυτά συνήθως αναπαράγουν ή μιμούνται τα φυσικά υποστρώματα. Τα εμπορικά διαθέσιμα τέτοιου είδους υποστρώματα είναι γενικά δυσδιάλυτα σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα αλλά και επιπλέον στερούνται αναλυτικής ευαισθησίας<sup>75</sup>. Για παράδειγμα, το πεπτίδιο L-S-F(4-NO<sub>2</sub>)-Nle-A-L-OMe έχει εξεταστεί ως ένα υπόστρωμα για διάφορες πρωτεάσες θηλαστικών αλλά και για πρωτεάσες από τους μύκητες *Mucor pusillus* και *Mucor miehei*<sup>76-77</sup>. Ωστόσο, αυτό το πεπτίδιο έχει πολύ μικρή διαλυτότητα και γι' αυτό περιορισμένη αξία, δεδομένου επίσης, ότι η χρήση του περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από μελέτες σε πολύ χαμηλές τιμές pH.

Η εξειδίκευση του ενζύμου της ρεννίνης από τον μύκητα *Mucor pusillus* προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την οξειδωμένη Β αλυσίδα της ινσουλίνης κι άλλα φυσικά υποστρώματα (**Πίνακας 1.2**), πέραν των συνθετικών πεπτιδίων<sup>78</sup>.

Πίνακας 1.2: Φυσικά υποστρώματα της ρεννίνης από το *Mucor pusillus*

Υπόστρωμα	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>	P' <sub>2</sub>	P' <sub>3</sub>	P' <sub>4</sub>
α <sub>2</sub> - μακρογλοβουλίνη	R	V	G	F	Y	E	S	D
α <sub>2</sub> - μακρογλοβουλίνη	T	E	T	V	R	K	Y	F
Οξειδωμένη Β-αλυσίδα ινσουλίνης	V	E	A	L	Y	L	V	Cya
Οξειδωμένη Β-αλυσίδα ινσουλίνης	E	A	L	Y	L	V	Cya	G
α-S <sub>1</sub> -καζεΐνη	L	L	R	F	F	V	A	P
β-καζεΐνη	P	I	Q	A	F	L	L	Y
κ-καζεΐνη	H	L	S	F	M	A	I	P

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ένζυμο εμφανίζει εξειδίκευση έναντι αρωματικών, ογκωδών ή υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων και στις δύο πλευρές του σημείου υδρόλυσης. Η ευαισθησία των πεπτιδικών υποστρωμάτων αυξάνει με την αύξηση του μοριακού μεγέθους τους, υποδεικνύοντας την σημασία της δευτερογενούς αλληλεπίδρασης για την υδρόλυση. Πιο συγκεκριμένα οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι το ένζυμο αυτό προτιμά υδρόφοβα κατάλοιπα στις θέσεις P<sub>1</sub> και P'<sub>1</sub> θέση, καθώς επίσης ότι το ένζυμο αυτό δεν δέχεται κατάλοιπο K στην P<sub>1</sub> θέση κι έτσι δεν ενεργοποιείται το θρυψινογόνο<sup>79-80</sup>. Η εξειδίκευση του ενζύμου από τον *M. pusillus* είναι σχεδόν ταυτόσημη με εκείνη του ενζύμου της ρεννίνης από τον *M. miehei* και παρόμοια με αυτά των συνήθων όξινων πρωτεϊνολυτικών που διαθέτουν ικανότητα ενεργοποίησης θρυψινογόνου, εκτός του ότι τα τελευταία δείχνουν εξειδίκευση έναντι βασικών καταλοίπων αμινοξέων στην καρβονυλική-πλευρά του σημείου διάσπασης.

Η δραστηριότητά τους όσον αφορά την πήξη του γάλακτος μπορεί να προσδιοριστεί με βάση το χρόνο που απαιτείται για την πήξη ενός διαλύματος 10% σκόνης γάλακτος<sup>81</sup>. Η ποσότητα του ενζύμου που μπορεί να προκαλέσει πήξη του διαλύματος γάλακτος ανά λεπτό ορίζεται στις 400 μονάδες (units). Η ειδική δραστηριότητα εκφράζεται ως η δραστηριότητά της επί της πήξης του γάλακτος ανά μονάδα απορρόφησης της πρωτεΐνης στα 280 nm. Η πρωτεολυτική τους δραστηριότητα μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση καζεΐνης, όξινα μετουσιωμένης

αιμοσφαιρίνης ή με τη χρήση του συνθετικού πεπτιδίου L-S-F(NO<sub>2</sub>)...Nle-A-L-OMe ως υποστρώματων<sup>82-84</sup>.

Λόγω της απουσίας κάποιου ευαίσθητου υποστρώματος, δεν έχει σχεδιαστεί κάποια απλή και στατιστικώς ισχυρή μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών που θα οδηγούσε και στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης τους. Το γεγονός αυτό αποτελεί πρόκληση δεδομένων των ποικίλων εφαρμογών των ασπάρτικο πρωτεϊνών από το *Mucor spp.* όχι μόνο στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών αλλά και σε (βιο)χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες.

### 1.3 Αλληλεπιδράσεις Πρωτεϊνών-Υποκαταστατών

#### 1.3.1 Υπολογιστική Προσομοίωση Μοριακής Πρόσδεσης (molecular docking)

Η διαδικασία πρόσδεσης πρωτεΐνης (ενζύμου) και υποκαταστάτη, ανεξάρτητα από την πραγματοποίηση αντίδρασης, καλείται πρωτεϊνική πρόσδεση και η κατανόηση της διαδικασίας αυτής αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα στην προσπάθεια αποκρυπτογράφησης των περισσότερων μεταβολικών αντιδράσεων<sup>85</sup>. Το **Σχήμα 1.8** απεικονίζει αυτήν την κατάσταση.



**Σχήμα 1.8:** Διαδικασία πρόσδεσης ενός μικρού μορίου (αναστολέα, υποστρώματος) σε έναν υποδοχέα για την δημιουργία ενός μοριακού συμπλόκου

Για να είναι σε θέση ο υποκαταστάτης να προσδεθεί στο ένζυμο, θα πρέπει να διαθέτει την κατάλληλη γεωμετρία ώστε να ταιριάζει στη θέση πρόσδεσης, αλλά και να αναπτύσσει τις απαιτούμενες αλληλεπιδράσεις (χημική συγγένεια) με τα άτομα των ομάδων της θέσης πρόσδεσης, ώστε να παραμείνει σταθερά προσδεμένος όσο χρειάζεται για να ασκήσει τη δράση του. Ας συμπληρωθεί το παραπάνω με το ότι προκειμένου η πρωτεΐνη/ένζυμο να βρεθεί σε ιδανική ενεργειακή ισορροπία για πρόσδεση, είναι αναγκαίο να συμβούν μια σειρά από μεταβολές στην

στερεοδιαμόρφωση της. Με δεδομένη την ύπαρξη εκατομμύριων πιθανών διαμορφώσεων, οι οποίες μπορούν να διαφέρουν σημαντικά, αναδεικνύεται καθαρά ότι η πρόβλεψη του τρόπου με τον οποίο τα δύο μόρια (ενζύμου - υποκαταστάτη) έρχονται σε επαφή μεταξύ τους, συνιστά το πρόβλημα της πρωτεϊνικής πρόσδεσης και βοηθά στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Δεν είναι λοιπόν, δύσκολο να αναδειχθεί η αδήριτη ανάγκη εισαγωγής και χρήσης ισχυρών ηλεκτρονικών υπολογιστών για να ελεγχθεί ο μεγάλος αριθμός πιθανών στερεοδιαμορφώσεων και να μειωθεί η πολυπλοκότητα των πειραμάτων που πρέπει να πραγματοποιηθούν<sup>85-86</sup>.

Το ενδιαφέρον, λοιπόν, των επιστημόνων στράφηκε στην ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων προσομοίωσης προσδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών (ενζύμων) και υποκαταστατών τους, ικανών να προβλέψουν με αυτόματο τρόπο την αλληλεπίδρασή τους<sup>87</sup>. Η υπολογιστική προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία προσομοίωσης για να γίνει δυνατή η πρόβλεψη της διαμόρφωσης ενός συμπλόκου πρωτεΐνης/ενζύμου-υποκαταστάτη όπου ο υποκαταστάτης είναι είτε ένα μικρό μόριο είτε και μια άλλη, συνήθως μικρή σε μοριακό βάρος, πρωτεΐνη (**Σχήμα 1.9**)<sup>88</sup>.



**Σχήμα 1.9:** Αναπαράσταση υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης

Μετά την πρωτοποριακή δουλειά των Wodak και Janin<sup>89</sup>, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, όπου περιέγραψαν τον πρώτο αυτοματοποιημένο αλγόριθμο docking για την πρόβλεψη της 3D αλληλεπίδρασης μεταξύ της παγκρεατικής θρυψίνης βοός και του φυσικού αναστολέα της σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην έρευνα των προσομοιώσεων πρόσδεσης, για την βελτίωση της υπολογιστικής ταχύτητας και της ακρίβειας. Κατά τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί πολλά σημαντικά βήματα πέρα από αυτό το σημείο.

Ο αποτελεσματικός χειρισμός της ευκαμψίας των πρωτεϊνών θεωρείται σήμερα μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στον τομέα των υπολογιστικών μεθόδων προσομοίωσης πρόσδεσης. Η θέση της περιοχής πρόσδεσης και ο προσανατολισμός κατά την πρόσδεση μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από ευελιξία του μορίου-προσδέτη (δηλ. του πρωτεϊνικού μορίου ενός ενζύμου). Η ανάπτυξη των υπολογιστικών συστημάτων έχει βοηθήσει πολλές νέες μεθόδους να ενσωματώσουν στους αλγόριθμους αναζήτησης την ευελιξία του ενζυμικού πρωτεϊνικού μορίου. Τα περισσότερα νέα λογισμικά περιλαμβάνουν τουλάχιστον την ελάχιστη ευελιξία της πρωτεΐνης (χρήση εναλλακτικών διαμορφώσεων των πλευρικών αλυσίδων, περιστροφή συγκεκριμένων δεσμών, κ.α.), καθώς η προσομοίωση πλήρους ευελιξίας των πρωτεϊνών συνεχίζει να αποτελεί ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα λόγω απαίτησης μεγαλύτερης υπολογιστικής ισχύος, συναρτήσεων κατάταξης μεγαλύτερης ακριβείας και χρόνου υπολογισμών<sup>90</sup>.

Ο αριθμός των λογισμικών (docking suites) καθώς και των αλγορίθμων που είναι διαθέσιμα για την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και υποκαταστατών είναι μεγάλος και διαρκώς αυξανόμενος. Επιπλέον, πολλοί αλγόριθμοι προσαρμόζουν διαφορετικές επεκτάσεις πάνω σε κοινές μεθοδολογίες με συνέπεια η προκύπτουσα ποικιλομορφία τόσο στην πολυπλοκότητα όσο και στην ταχύτητα να οδηγεί σε πληθώρα τεχνικών για την αντιμετώπιση των σύγχρονων προβλημάτων των μοριακών αλληλεπιδράσεων και του δομημένου σχεδιασμού φαρμάκων<sup>91</sup>.

### 1.3.1.α Μεθοδολογία υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης

Για να εφαρμόσει κάποιος την μεθοδολογία υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης, το πρώτο ζητούμενο είναι η δομή της πρωτεΐνης που τον ενδιαφέρει. Συνήθως η δομή έχει προκαθοριστεί χρησιμοποιώντας μια βιοφυσική τεχνική όπως κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ<sup>92</sup>, ή λιγότερο συχνά, NMR φασματοσκοπία<sup>93</sup>. Η δομή της πρωτεΐνης και ένας πιθανός υποκαταστάτης, αποτελούν τα δεδομένα εισόδου για ένα πρόγραμμα υπολογιστικής προσομοίωσης πρόσδεσης (υποκαταστάτη, δηλαδή είτε αναστολέα, είτε και υποστρώματος). Η επιτυχία ενός τέτοιου υπολογιστικού προγράμματος εξαρτάται από δύο συστατικά: την στρατηγική ή αλγόριθμο αναζήτησης (search strategy or search algorithm) και μια συνάρτηση επιτυχίας-αξιολόγησης (scoring function).

Ο ρόλος της στρατηγικής αναζήτησης είναι να διερευνά με αποδοτικό τρόπο τον χώρο διαμορφώσεων του υποκαταστάτη και του υποδοχέα. Στόχος της είναι να εντοπίσει τον προσανατολισμό και τη διαμόρφωση των μορίων που αλληλεπιδρούν, που αντιστοιχεί στην ελάχιστη τιμή της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης. Εν συνεχεία η συνάρτηση αξιολόγησης (scoring function), η οποία αποτελεί προσέγγιση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση και διαβάθμιση των διαμορφώσεων υποκαταστάτη-υποδοχέα που προκύπτουν από το στάδιο της αναζήτησης<sup>90</sup>.

Απαραίτητη βέβαια προϋπόθεση για την υλοποίηση της μεθόδου είναι η υπολογιστική αναπαράσταση των εμπλεκόμενων μορίων (υποκαταστάτη και υποδοχέα), ώστε να μπορούν να συμμετέχουν στην τεχνική αναζήτησης και να συμβάλουν στον υπολογισμό της συνάρτησης αξιολόγησης. Η άμεση προσέγγιση στην αναπαράσταση των εμπλεκόμενων μορίων είναι η χρήση συντεταγμένων για κάθε άτομό τους. Αυτό είναι συνηθισμένο για τον υποκαταστάτη που είναι μόριο μικρού μεγέθους αλλά όχι για τον υποδοχέα που είναι ένα πολύ μεγαλύτερο μόριο και μια αναπαράσταση με τις συντεταγμένες όλων των ατόμων δεν θα ήταν εύκολα διαχειρίσιμη. Δεδομένου ότι αυτό που μας ενδιαφέρει κατά τη διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης, είναι η πρόσδεση του υποψηφίου υποκαταστάτη σε μία καλά προσδιορισμένη περιοχή του υποδοχέα, η αναπαράσταση του υποδοχέα περιορίζεται συνήθως σε μια περιοχή γύρω από τη θέση πρόσδεσης.

### 1.3.1.β Αλγόριθμοι αναζήτησης

Στην θεωρία, το διάστημα αναζήτησης αποτελείται από όλους τους δυνατούς προσανατολισμούς και τις διαμορφώσεις του υποκαταστάτη μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης του υποδοχέα. Μεταξύ των διαμορφώσεων αυτών θα πρέπει να περιλαμβάνεται και η κατάλληλη διαμόρφωση για το πρόβλημα που διερευνάται. Ωστόσο στην πράξη με τις σημερινές υπολογιστικές τεχνικές, είναι απίθανο να εξερευνήσουμε εξονυχιστικά όλο το διάστημα αναζήτησης. Αυτό θα περιλάμβανε την απαρίθμηση όλων των πιθανών παραμορφώσεων του κάθε μορίου (τα μόρια είναι δυναμικά και βρίσκονται σε ένα σύνολο διαμορφωτικών καταστάσεων) και όλων των πιθανών περιστροφικών προσανατολισμών των υποστρωμάτων που συνδέονται με την πρωτεΐνη. Τα περισσότερα προγράμματα μοριακής μοντελοποίησης πρόσδεσης βασίζονται σε ένα ευλύγιστο υπόστρωμα (κινείται μόνο αυτό στο διάστημα

αναζήτησης) και αρκετά προσπαθούν να μοντελοποιήσουν έναν ευλύγιστο υποδοχέα-πρωτεΐνη.

Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την εύρεση του διαστήματος διαμόρφωσης (conformational space) μέσα στο οποίο συνδέονται η πρωτεΐνη με το υπόστρωμα, οι περισσότερες από τις οποίες είναι δανεισμένες από άλλα (επιστημονικά και τεχνολογικά) πεδία<sup>94</sup>. Οι σημαντικότερες είναι:

- Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics simulations).
- Προσομοιώσεις Monte Carlo (Monte Carlo simulations).
- Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic Algorithms).
- Μέθοδοι βασισμένες στην τμηματοποίηση (Fragment-based methods).
- Μέθοδοι βασισμένες στην συμπληρωματικότητα σημείων (Point complementarity methods).
- Μέθοδοι βασισμένες στην γεωμετρία αποστάσεων (Distance geometry methods).
- Αναζητήσεις tabu (Tabu Searches).
- Συστηματικές αναζητήσεις (Systematic Searches).
- Υβριδικές μέθοδοι (Hybrid Methods)

Η διαφορά τους έγκειται στην στρατηγική αναζήτησης μέσα στο πλαίσιο του χώρου διαμορφώσεων, ώστε να επιτευχθεί την αποδοτικότερη δειγματοληψία του. Η μέθοδος αναζήτησης Monte Carlo (MC) χρησιμοποιείται ευρέως στις υπολογιστικές προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (docking)<sup>95,96</sup> και είναι αυτή που υιοθετείται από το πρόγραμμα Glide που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την πραγματοποίηση των υπολογισμών.

Η χρήση των MC μεθόδων δίνει τη δυνατότητα επίλυσης σύνθετων προβλημάτων τα οποία δεν θα ήταν δυνατό να επιλυθούν με αιτιοκρατικό (deterministic) τρόπο. Για παράδειγμα η επίλυση εξισώσεων που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ατόμων είναι σχετικά απλή, η επίλυση όμως των ίδιων εξισώσεων για εκατοντάδες χιλιάδες άτομα είναι αδύνατη. Με τις MC μεθόδους, ένα μεγάλο σύστημα δειγματοληπτείται σε έναν αριθμό τυχαίων διαμορφώσεων και τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περιγραφή της συμπεριφοράς ολόκληρου του συστήματος.

Στη μοριακή πρόσδεση η έκφραση Monte Carlo συνήθως σημαίνει δειγματοληψία σημαντικότητας ή Metropolis μέθοδος<sup>96</sup>. Η μέθοδος Metropolis



παράγει τυχαίες κινήσεις στο σύστημα. Για κάθε φορά, αν η νέα κατάσταση αξιολογείται καλύτερα από την προηγούμενη (σύμφωνα με την ενέργεια του συστήματος) τότε γίνεται δεκτή αμέσως. Αν όμως δεν οδηγεί σε μια νέα ελάχιστη ενέργεια, τότε εφαρμόζεται μια συνάρτηση πιθανότητας κατά Boltzmann. Αν η λύση περάσει το τεστ αυτής της συνάρτησης τότε γίνεται δεκτή. Αν όχι, απορρίπτεται. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός διαμορφώσεων.

### 1.3.1.γ Συναρτήσεις επιτυχίας-αξιολόγησης

Στα πεδία της υπολογιστικής χημείας και της μοριακής μοντελοποίησης, οι συναρτήσεις επιτυχίας (scoring functions) είναι γρήγορες μαθηματικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την σχέση πρόσδεσης (binding affinity) μεταξύ δυο μορίων αφού έχουν ήδη συνδεθεί.

Έτσι, αφού εφαρμοστεί ο κατάλληλος αλγόριθμος αναζήτησης για να βρεθεί το διάστημα διαμόρφωσης για την διάκριση μεταξύ των “καλών” και “κακών” διαμορφώσεων πρόσδεσης και την επιλογή των υποκαταστατών με την καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης μέσα από μια δεξαμενή υποψηφίων μορίων, είναι απολύτως απαραίτητη η χρησιμοποίηση αξιόπιστης αλλά και αποδοτικής συνάρτησης αξιολόγησης ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση οποιουδήποτε συμπλόκου υποκαταστάτη-υποδοχέα σε συγκεκριμένη διαμόρφωση. Πραγματικά, χωρίς μία καλή συνάρτηση αξιολόγησης ακόμα και ο αποτελεσματικότερος αλγόριθμος αναζήτησης θα ήταν μη λειτουργικός<sup>97</sup>.

Οι μέθοδοι μοριακής αναγνώρισης χρησιμοποιούν τις συναρτήσεις αξιολόγησης με δύο τρόπους. Η *πρώτη προσέγγιση* χρησιμοποιεί την πλήρη συνάρτηση αξιολόγησης, για να βαθμολογήσει τους διάφορους σχηματισμούς υποδοχέα-υποκαταστάτη που προκύπτουν από τον αλγόριθμο αναζήτησης. Με βάση την αξιολόγηση, είναι δυνατόν να γίνει τροποποίηση του συστήματος από τον αλγόριθμο αναζήτησης και να εφαρμοστεί και πάλι η ίδια συνάρτηση αξιολόγησης για να βαθμολογήσει τους νέους σχηματισμούς. Η *εναλλακτική προσέγγιση* χρησιμοποιεί τη συνάρτηση αξιολόγησης σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, μια απλοποιημένη μορφή της συνάρτησης χρησιμοποιείται για να κατευθύνει τη στρατηγική αναζήτησης και μια πιο ακριβής μορφή της, χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει τους σχηματισμούς που προκύπτουν<sup>93,97</sup>. Αυτές οι κατευθυνόμενες μέθοδοι κάνουν υποθέσεις σχετικά με τον υπερχώρο ενεργειών, παραλείποντας συχνά υπολογιστικά ακριβούς όρους όπως

ηλεκτροστατικές δυνάμεις, και λαμβάνουν υπόψη μόνο μερικούς όρους, όπως δεσμούς υδρογόνου. Αυτοί οι αλγόριθμοι κατευθύνονται, συνεπώς, σε περιοχές μεγαλύτερης σπουδαιότητας όπως αυτές καθορίζονται από την απλοποιημένη συνάρτηση αξιολόγησης. Κάθε αλγόριθμος χρησιμοποιεί μία συγκεκριμένη συνάρτηση για την αξιολόγηση του αποτελέσματος και για να γίνει περισσότερο κατανοητός ο τρόπος που χρησιμοποιείται, κρίνεται σκόπιμη η περιγραφή της στο πλαίσιο του χρησιμοποιούμενου αλγορίθμου από το αντίστοιχο πρόγραμμα υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης<sup>97</sup>.

#### **1.3.1.δ Το πρόγραμμα υπολογιστικών προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης Glide**

Το πρόγραμμα υπολογιστικών προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) που αποτελεί τμήμα του λογισμικού μοριακής μοντελοποίησης Schrödinger χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη<sup>98</sup>.

Η προσέγγιση που ακολουθείται στην συνάρτηση Glide περιλαμβάνει μία πλήρη συστηματική αναζήτηση του χώρου διαμορφώσεων, προσανατολισμών και θέσεων του ενζύμου. Σε αυτή την αναζήτηση, μία αρχική μειωμένης ακρίβειας φάση τοποθέτησης και αξιολόγησης, που μειώνει δραματικά το χώρο αναζήτησης, ακολουθείται από μία ελαχιστοποίηση ευέλικτη στις γωνίες συστροφής, σε ένα πλέγμα δυναμικών που βασίζεται στο OPLS-AA δυναμικό πεδίο. Οι καλύτεροι υποψήφιοι βελτιώνονται ακόμα περισσότερο με χρήση δειγματοληψίας Monte Carlo και η καλύτερη τοποθέτηση επιλέγεται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο συνάρτησης ενέργειας, που συνδυάζει την εμπειρική συνάρτηση αξιολόγησης ChemScore<sup>99</sup> με όρους δυναμικού πεδίου.

#### **Συνάρτηση Αξιολόγησης**

Η συνάρτηση αξιολόγησης που χρησιμοποιείται αποτελεί επέκταση της συνάρτησης αξιολόγησης ChemScore, που την ονομάζουν GlideScore και αποτελεί έναν συνδυασμό των:

- ChemScore (περιλαμβάνει λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου καθώς και λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις),

- Ενέργειας αλληλεπίδρασης μοριακής μηχανικής μεταξύ υποκαταστάτη και ενζύμου (αλληλεπιδράσεις Coulomb και van der Waals) και μιας ενέργειας εντάσεων του υποκαταστάτη.

Για να συμπεριλάβει την επίδραση του διαλύτη η GlideScore, προσδένει ξεχωριστά μόρια νερού, σε κάθε ενεργητικά ανταγωνιστική τοποθέτηση του υποκαταστάτη και εισάγει εμπειρικούς όρους που μετρούν την έκθεση των διαφόρων ομάδων στα ξεχωριστά μόρια νερού<sup>100</sup>.

### **Τεχνική Αναζήτησης**

Η συνάρτηση Glide χρησιμοποιεί μια σειρά από ιεραρχικά φίλτρα αναζητώντας πιθανές τοποθετήσεις του υποκαταστάτη στην ενεργό περιοχή του ενζύμου (Εικόνα 1)<sup>100</sup>. Το σχήμα και οι ιδιότητες του ενζύμου παρουσιάζονται επάνω σε πλέγμα με διαφορετικές συστοιχίες πεδίων που παρέχουν προοδευτικά όλο και μεγαλύτερη βαθμολόγηση της υπό μελέτη στάσης του υποκαταστάτη. Αυτά τα πεδία δημιουργούνται ως βήματα προ-επεξεργασίας στον υπολογισμό και ως εκ τούτου θα πρέπει να υπολογίζονται μόνο μια φορά για κάθε πρωτεΐνη/ένζυμο.

Το επόμενο στάδιο παράγει ένα σύνολο από αρκετές αρχικές διαμορφώσεις του υποκαταστάτη. Αυτές οι διαμορφώσεις επιλέγονται από μια εξαντλητική απαρίθμηση των ελαχίστων, στο διάστημα της γωνίας στρέψης του υποκαταστάτη και παρουσιάζονται σε συνεπτυγμένες μορφές. Με δεδομένες αυτές τις διαμορφώσεις του υποκαταστάτη πραγματοποιούνται πολλαπλές κινήσεις και περιστροφές του ώστε να βρεθούν οι πιο κατάλληλες στάσεις του. Όλες αυτές οι κινήσεις μειώνουν δραστικά την περιοχή που σε αυτήν θα μπορούσε να δαπανηθεί πολύτιμη ενέργεια και υπολογιστικός χρόνος, αναγκαίος για επόμενους υπολογισμούς, ενώ αποφεύγεται και η χρήση στοχαστικών μεθόδων (που με αυτές θα μπορούσε να χαθούν σημαντικά στιγμιότυπα)<sup>101</sup>.

Φαίνεται ως πιθανότερο ότι η συνάρτηση Glide είναι μοναδική από τις τεχνικές της εξαντλητικής συστηματικής αναζήτησης διαμέσου προσεγγίσεων και περικοπών που απαιτούνται και να φθάσει κάποιος σε ένα αποδεκτό αποτέλεσμα και με αποδεκτές υπολογιστικές ταχύτητες. Ξεκινώντας από τις στάσεις που έχουν αντληθεί με βάση κάποιο αρχικό σύνολο στάσεων, ο υποκαταστάτης ελαχιστοποιείται στο πεδίο του ενζύμου με χρήση μιας τυπικής συνάρτησης ενέργειας μοριακής μηχανικής σε συνδυασμό με ένα διηλεκτρικό μοντέλο εξαρτώμενο από την απόσταση. Τελικά παράγονται τρεις ως έξη στάσεις χαμηλής ενέργειας, οι οποίες υπόκεινται σε

διαδικασία τυχαιοποίησης Monte Carlo, όπου εξετάζονται τα πλησιέστερα ελάχιστα στρέψης. Η διαδικασία αυτή είναι πιο αναγκαία σε περιπτώσεις όπου περιφερειακές ομάδες αμινοξικών καταλοίπων είναι κατάλληλα προσανατολισμένες και ενίοτε τροποποιούν τις εσωτερικές γωνίες στρέψης<sup>101</sup>.

### 1.3.2 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

#### 1.3.2.α Εισαγωγή και Βασικές αρχές της κλασικής μοριακής δυναμικής

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έγινε δυνατή η προσομοίωση της δυναμικής μοριακών συστημάτων με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ως αποτέλεσμα, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics - MD), αποτελούν στις μέρες μας ένα σημαντικό εργαλείο για την πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποκαταστάτη και ενζύμου κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης<sup>102-103</sup>.

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, ένα δυναμικό πεδίο δυνάμεων χρησιμοποιείται για να υπολογίσει τις δυνάμεις σε κάθε άτομο του προσομοιωμένου συστήματος. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τις εξισώσεις κίνησης της κλασικής μηχανικής (Νευτώνεια Μηχανική), υπολογίζονται ταχύτητες και επιταχύνσεις και τα άτομα μετακινούνται ελαφρά με συγκεκριμένο χρονικό βήμα. Η προσομοίωση γίνεται περισσότερο ακριβής, όσο μικρότερο είναι το χρονικό βήμα της μετακίνησης και όσο περισσότερα είναι τα άτομα που συμμετέχουν στην προσομοίωση<sup>102</sup>.

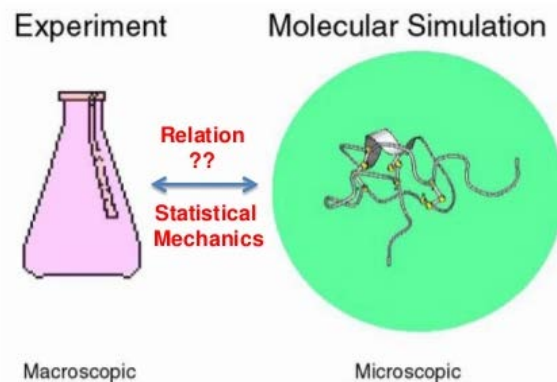
Ένα από τα δύο βασικότερα λοιπόν προβλήματα στη μοριακή δυναμική είναι, πώς θα εξερευνηθεί αποτελεσματικά ο πελώριος χώρος των πιθανών διαμορφώσεων ο οποίος περιλαμβάνει όλες τις πιθανές μοριακές διαμορφώσεις που είναι συμβατές με την θερμοδυναμική κατάσταση του συστήματος σε θερμική ισορροπία<sup>104</sup>. Το δεύτερο βασικό πρόβλημα είναι η παραγωγή μιας ικανοποιητικά ακριβούς συνάρτησης ολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης ή ενός πεδίου δυνάμεων. Σημαντικό κομμάτι συνεπώς της τέχνης των υπολογιστικών προσομοιώσεων είναι η επιλογή των αναπόφευκτων υποθέσεων, προσεγγίσεων και απλοποιήσεων του μοριακού μοντέλου και της υπολογιστικής διαδικασίας, έτσι ώστε να επηρεάζουν όσο το δυνατό λιγότερο την ιδιότητα η οποία μας ενδιαφέρει<sup>105</sup>.

Η διαδικασία που ακολουθεί ένα πρόγραμμα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής βιολογικών συστημάτων συνοψίζεται ως εξής:

-Σε ένα πρώτο στάδιο με την βοήθεια μιας συνάρτησης ολικής δυναμικής ενέργειας (force field) υπολογίζεται η συνισταμένη δύναμη που ασκείται σε κάθε άτομο του συστήματος βάσει των συντεταγμένων των ατόμων στον χώρο σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

-Σε ένα επόμενο στάδιο με βάση τις παραπάνω δυνάμεις, χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις κίνησης της κλασικής μηχανικής υπολογίζονται: αρχικά η επιτάχυνση και εν συνεχεία η νέα θέση και η νέα ταχύτητα που θα έχει το κάθε άτομο μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το χρονικό αυτό διάστημα καλείται βήμα της προσομοίωσης (timestep).

Όπως είναι αναμενόμενο η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα (steps). Έτσι προκύπτουν οι τροχιές των ατόμων μέσα στον χρόνο (trajectories). Στη συνέχεια βάσει αυτών των τροχιών μπορούν να υπολογιστούν αρκετές ιδιότητες. Σκοπός των υπολογιστικών προσομοιώσεων είναι να υπολογιστεί η μακροσκοπική συμπεριφορά του συστήματος μέσω των αλληλεπιδράσεων σε μικροσκοπικό επίπεδο. Η σύνδεση μεταξύ της συμπεριφοράς του συστήματος σε μικροσκοπικό επίπεδο και των μακροσκοπικών του ιδιοτήτων κυβερνάται από νόμους της στατιστικής μηχανικής (**Εικόνα 1.11**)<sup>106-107</sup>.



**Εικόνα 1.11:** Αναπαράσταση της σύνδεσης της μακροσκοπικής συμπεριφοράς ενός συστήματος μέσω των αλληλεπιδράσεων σε μικροσκοπικό επίπεδο (προσομοίωση μοριακής δυναμικής).

Η χρησιμοποίηση των κλασικών MD τεχνικών για την εύρεση της συνολικά ελάχιστης ενέργειας ενός συμπλόκου υποκαταστάτη-ενζύμου είναι αρκετά δύσκολη και ισχυρά εξαρτώμενη από την αρχική διαμόρφωση, όπως κοινά συμβαίνει σε κάθε τέτοια διαδικασία προσαρμογής. Η συνδυασμένη χρήση των τεχνικών εξομοίωσης

MD με τις υπολογιστικές προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της φυσικής βάσης της δομής και της λειτουργίας των βιολογικών μακρομορίων<sup>104,108</sup>.

### 1.3.2.β Διαδικασία μιας προσομοίωσης

Προκειμένου λοιπόν να πραγματοποιηθεί μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής έχουν αναπτυχθεί διάφορα προγράμματα όπως είναι το Desmond, το NAMD, το AMBER και το GROMACS. Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το Desmond, το οποίο αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του D.E. Shaw για την εκτέλεση υψηλής ταχύτητας προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής σε βιολογικά συστήματα<sup>109-110</sup>. Ο κώδικας του λογισμικού αυτού χρησιμοποιεί παράλληλους αλγορίθμους και αριθμητικές τεχνικές για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση και είναι διαθέσιμο δωρεάν για μη εμπορική χρήση από πανεπιστήμια και άλλα μη κερδοσκοπικά ερευνητικά ιδρύματα.

Τα βήματα και οι βασικές φάσεις (**Σχήμα 1.10**) από τις οποίες θα περάσει το σύστημα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής είναι οι εξής<sup>105, 109, 111</sup>:

**Εκκίνηση:** Για να ξεκινήσει η προσομοίωση μοριακής δυναμικής, θα πρέπει να καθοριστεί η αρχική διαμόρφωση του συστήματος (κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, τομογραφία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, μοντελοποίηση με βάση την ομολογία του μορίου με άλλα μόρια), κάτι που πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή, δεδομένου ότι μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της προσομοίωσης. Μια καλή τακτική είναι να επιλεγεί μια δομή κοντά στην κατάσταση που θέλουμε να προσομοιώσουμε. Πριν την έναρξη της προσομοίωσης συνίσταται να εκτελεστεί ελαχιστοποίηση ενέργειας στην αρχική δομή, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές ισχυρές αλληλεπιδράσεις van der Waals, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε τοπική παραμόρφωση και τελικά σε μη σταθερή προσομοίωση.

Στο σημείο αυτό προστίθενται ξεχωριστά μόρια νερού στο σύστημα, ώστε να διαλυτοποιήσουν την πρωτεΐνη, με την κατάλληλη βέβαια επεξεργασία.

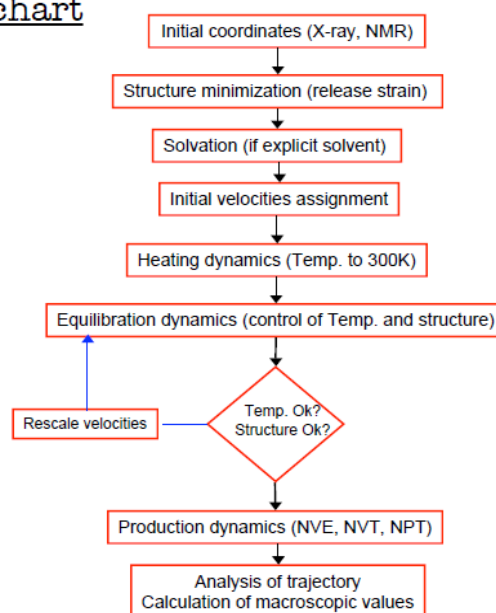
**Θέρμανση του συστήματος:** Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει καταχώρηση αρχικών ταχυτήτων σε χαμηλή θερμοκρασία, για κάθε άτομο του συστήματος και ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα, ώστε να εξελιχθεί το σύστημα στον χρόνο. Στην περίπτωση που στο σύστημα περιλαμβάνονται ξεχωριστά μόρια νερού, οι θέσεις της πρωτεΐνης σταθεροποιούνται αρχικά, ώστε να επιτραπεί στα

μόρια νερού να προσαρμοστούν σε σχέση με την πρωτεΐνη. Από τη στιγμή που τα μόρια νερού έρθουν σε ισορροπία αίρονται οι περιορισμοί και το όλο σύστημα μπορεί να εξελιχθεί στο χρόνο. Περιοδικά, κατά την εξέλιξη του συστήματος, νέες ταχύτητες καταχωρούνται σε ελαφρά υψηλότερες θερμοκρασίες και η διαδικασία συνεχίζεται, έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία.

**Εξισορρόπηση:** Από τη στιγμή που η επιθυμητή θερμοκρασία έχει επιτευχθεί, η προσομοίωση του συστήματος πρωτεΐνης/νερού συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης ελέγχονται διάφορες ιδιότητες, όπως η δομή, η πίεση, η θερμοκρασία και η ενέργεια. Το νόημα της συγκεκριμένης φάσης είναι να εκτελεστεί η προσομοίωση, έως ότου αυτές οι ιδιότητες σταθεροποιηθούν σε σχέση με το χρόνο. Αν η θερμοκρασία αυξομειώνεται σημαντικά, οι ταχύτητες θα πρέπει να διαβαθμιστούν έτσι ώστε η θερμοκρασία να επιστρέψει κοντά στην επιθυμητή τιμή.

**Φάση παραγωγής:** Το τελευταίο βήμα της προσομοίωσης, περιλαμβάνει προσομοίωση σε φάση παραγωγής για το επιθυμητό μήκος χρόνου (από μερικές εκατοντάδες ps έως ns ή και περισσότερο). Στη διάρκεια της φάσης αυτής υπολογίζονται οι τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων.

### MD flowchart



**Σχήμα 1.10:** Βήματα μιας προσομοίωσης MD.

Όταν προσομοιώνεται ένα σύστημα περιορισμένων διαστάσεων πρέπει να δώσουμε προσοχή στον τρόπο με τον οποίο θα χειριστούμε τα όρια του συστήματος. Η απλούστερη επιλογή είναι η προσομοίωση στο κενό. Όταν όμως προσομοιώνεται υγρό, διάλυμα ή στερεό και όχι μόριο σε αέρια φάση τότε προκειμένου να

περιοριστούν φαινόμενα που παρουσιάζονται στα άκρα του συστήματος εφαρμόζονται περιοδικές ή σφαιρικές οριακές συνθήκες<sup>104-105</sup>.

Στο εικονικό μας εργαστήριο λοιπόν μπορούμε να υποβάλουμε το σύστημα μας στις επιθυμητές-ιδανικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, ώστε το μοριακό μοντέλο που θα προκύψει να οδηγεί σε όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

### 1.3.3 Συνδυαστική χρήση τεχνικών υπολογιστικής προσομοίωσης πρόσδεσης και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής

Γρήγορα και ανέξοδα πρωτόκολλα υπολογιστικής προσομοίωσης πρόσδεσης (docking) μπορούν να συνδυαστούν με πιο ακριβείς αλλά πιο δαπανηρές τεχνικές MD για να επιβεβαιωθούν οι υποψήφιες καταστάσεις πρόσδεσης (poses) και να προβλέψουμε πιο αξιόπιστα σύμπλοκα πρωτεΐνης-υποκαταστάτη<sup>108</sup>. Η ισχύς αυτού του συνδυασμού έγκειται στην αλληλοσυμπλήρωση δυνατοτήτων και αδυναμιών τους. Αφενός, οι τεχνικές προσομοίωσης πρόσδεσης χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση του τεράστιου διαμορφωτικού χώρου των υποκαταστατών σε σύντομο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την εξέταση μεγάλου εύρους αυτών. Τα κύρια μειονεκτήματα είναι η έλλειψη ή η κακή ευκαμψία της πρωτεΐνης, η οποία δεν επιτρέπει να προσαρμοστεί η διαμόρφωση της κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη και η απουσία μιας μοναδικής και ευρέως εφαρμόσιμης συνάρτησης βαθμολόγησης, αναγκαία για αξιόπιστη κατάταξη των τελικών συμπλόκων. Από την άλλη πλευρά, οι προσομοιώσεις MD επιτρέπουν -δίνουν την δυνατότητα να διαπιστωθεί- να επιβεβαιωθεί αν το πιο ευνοούμενο ή επικρατέστερο ή πιθανό σύμπλοκο που προέκυψε από υπολογισμούς προσομοίωσης πρόσδεσης επαληθεύεται επίσης από την μέθοδο MD<sup>102,103,108</sup>.

Στην πραγματικότητα, η στατική άποψη που παρέχεται από τη μέθοδο μοριακής προσομοίωσης πρόσδεσης (molecular docking) θα πρέπει να επαληθεύεται και με τη χρήση MD. Στην περίπτωση μας η πραγματοποίηση μιας προσομοίωσης MD είναι επίσης χρήσιμη για να επιβεβαιώσει εάν οι σημαντικότερες επαφές που βρέθηκαν διατηρούνται κατά τη διάρκεια της MD, προκειμένου να οδηγηθούμε σε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, οι επιδράσεις των υπάρχοντων μορίων νερού μπορούν να μελετηθούν άμεσα αλλά και να υπολογιστούν με ακρίβεια οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης. Ωστόσο, τα κύρια



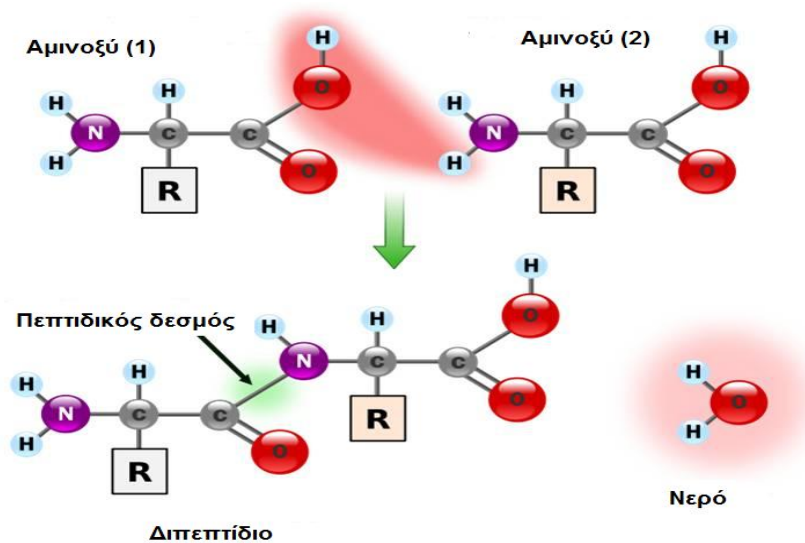
προβλήματα με τις προσομοιώσεις MD είναι ότι είναι χρονοβόρες και ότι το σύστημα μπορεί να παγιδευτεί σε τοπικά ελάχιστα.

Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός των δύο τεχνικών *in silico* σε ένα πρωτόκολλο όπου η υπολογιστική προσομοίωση πρόσδεσης (docking) χρησιμοποιείται για την ταχεία διαλογή μεγάλου αριθμού υποκαταστατών και στη συνέχεια εφαρμόζονται προσομοιώσεις MD για να διερευνήσουν τις διαμορφώσεις της πρωτεΐνης, να βελτιστοποιήσουν τις δομές των τελικών συμπλόκων και να υπολογίσουν με ακριβή τρόπο ενέργειες, είναι μια λογική προσέγγιση για τη βελτίωση των τρόπων πρόσδεσης ενζύμων-υποκαταστατών<sup>108</sup>.

## 1.4 Πεπτιδική σύνθεση

### 1.4.1 Εισαγωγή

Η σύνδεση μεταξύ δυο αμινοξέων στα πεπτίδια και στις πρωτεΐνες πραγματοποιείται με τη συμμετοχή του  $\alpha$ -καρβοξυλίου του πρώτου αμινοξέος και της  $\alpha$ -αμινομάδας του δεύτερου. Ο δεσμός αυτός αποκαλείται **πεπτιδικός ή αμιδικός δεσμός**. (Σχήμα 1.11).



**Σχήμα 1.11** : Σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού

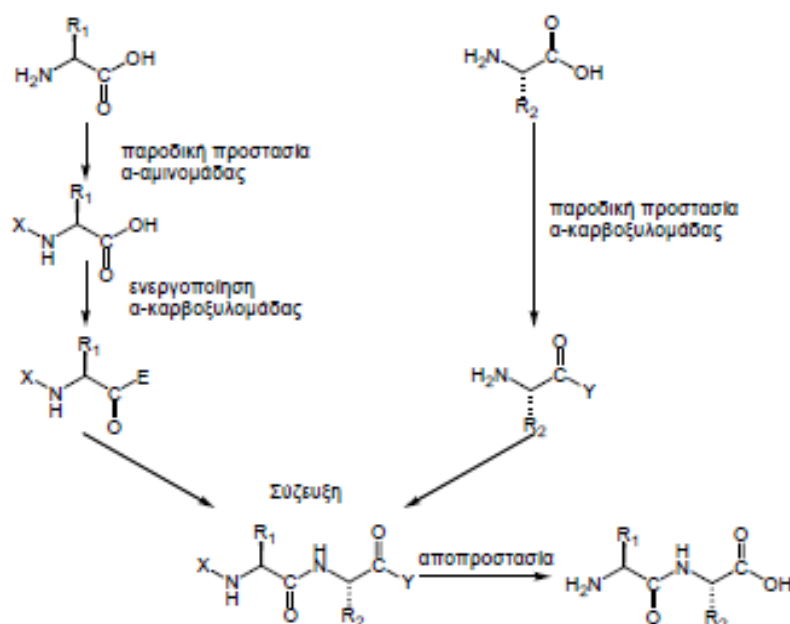
Ο πεπτιδικός δεσμός αποτελεί μία άκαμπτη και επίπεδη περιοχή του μορίου. Το υδρογόνο της αμινομάδας είναι πάντα *trans* ως προς το οξυγόνο του καρβοξυλίου. Οι Pauling και Corey πρώτοι ανακάλυψαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ότι η δυνατότητα περιστροφής γύρω από το δεσμό του καρβοξυλικού ατόμου του άνθρακα και του αζώτου, δεν υπάρχει στην επίπεδη μονάδα, διότι ο δεσμός αυτός παίρνει

μερικώς τον χαρακτήρα διπλού δεσμού<sup>112</sup>. Το μήκος του δεσμού είναι 1.32 Å, μεταξύ δηλαδή ενός απλού C-N (1.49 Å) και ενός διπλού C=N (1.27 Å). Οι δεσμοί μεταξύ του  $\alpha$ -άνθρακα και του ατόμου άνθρακα του καρβοξυλίου και μεταξύ  $\alpha$ -άνθρακα και του ατόμου του αζώτου του πεπτιδικού δεσμού είναι επίσης απλοί δεσμοί.

Εξαιτίας της διπολικής φύσης των αμινοξέων η αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού δεν ευνοείται θερμοδυναμικά ( $\Delta H = 4\text{kcal/mole}$ ) και για αυτό και δεν πραγματοποιείται αυθόρμητα, αλλά απαιτεί υψηλή ενέργεια, πράγμα ανεπιθύμητο για τις ενώσεις πρωτεϊνικής και πεπτιδικής φύσης κι έτσι η σύζευξη πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών παραγώγων των αμινοξέων με ήπιες μεθόδους. Συγκεκριμένα, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Προστατεύεται παροδικά με κατάλληλη ομάδα X η  $\alpha$ -αμινομάδα του N-τελικού αμινοξέος, ώστε να μη μπορεί να δράσει πλέον ως πυρηνόφιλο.
- Προστατεύεται παροδικά με κατάλληλη ομάδα Y η  $\alpha$ -καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος.
- Προστατεύονται παροδικά οι πλευρικές δραστικές ομάδες των αμινοξέων (αν υπάρχουν) ώστε να μην είναι δυνατή η συμμετοχή τους σε παράπλευρες αντιδράσεις.
- Ενεργοποιείται η  $\alpha$ -καρβοξυλομάδα του N-τελικού αμινοξέος, μετατρέπεται δηλαδή στο ενεργοποιημένο παράγωγο X-NH-C(R<sub>1</sub>)-CO-E.
- Ακυλιώνεται η πυρηνόφιλη  $\alpha$ -αμινομάδα του C-τελικού αμινοξέος από τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα του ενεργοποιημένου παραγώγου σχηματίζοντας πεπτιδικό δεσμό.
- Απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες με κατάλληλες συνθήκες που δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα του πεπτιδικού δεσμού και τη φύση του μορίου.

Στο **Σχήμα 1.12** παρουσιάζονται τα στάδια που ακολουθούνται για τη σύζευξη δύο αμινοξέων.



Σχήμα 1.12 : Γενικό σχήμα σύνθεσης διπεπτιδίου

### 1.4.2 Προστατευτικές ομάδες

Η προστασία των δραστικών ομάδων των αμινοξέων είναι απαραίτητη κατά την πεπτιδική σύνθεση προς αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Η επιλογή των κατάλληλων προστατευτικών ομάδων, όπως και οι συνθήκες προστασίας και αποπροστασίας των αμινοξέων, εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων που σχετίζονται άμεσα με το σχεδιασμό της συνθετικής διαδικασίας. Οι προστατευτικές ομάδες διακρίνονται σε: (i) αμινοπροστατευτικές (N<sup>α</sup>-προστατευτικές), οι οποίες χρησιμοποιούνται για την προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων, (ii) καρβοξυπροστατευτικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την προστασία της α-καρβοξυλομάδας των αμινοξέων και (iii) ομάδες για την προστασία των πλευρικών δραστικών ομάδων των αμινοξέων.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί κατάλληλη μια προστατευτική ομάδα θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια, όπως:

- ✓ Να εισάγεται εύκολα στο αμινοξύ χωρίς να επηρεάζεται η χημική ή η στερεοχημική φύση του.
- ✓ Να μπορεί να προστατεύει αποτελεσματικά την προς προστασία ομάδα καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, παραμένοντας σταθερή στις συνθήκες που επικρατούν.
- ✓ Να αποφεύγεται η ρακεμίσωση του χειρόμορφου κέντρου του αμινοξέος.

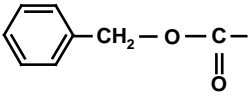
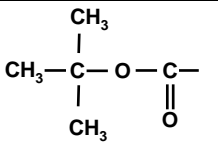
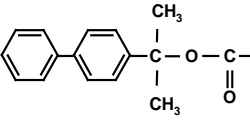
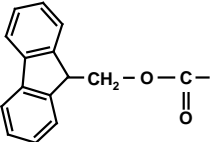
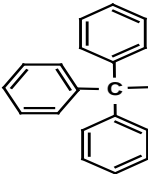
- ✓ Να καθιστούν το αμινοξύ διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις συζεύξεις.
- ✓ Να απομακρύνονται εύκολα, γρήγορα και ποσοτικά κάτω από ήπιες συνθήκες στο τέλος ή σε ενδιάμεσα στάδια της σύνθεσης.
- ✓ Να έχει χαμηλό κόστος.

#### 1.4.2.α Προστασία της $\alpha$ -Αμινομάδας των Αμινοξέων

Η επιλογή του τρόπου προστασίας της  $\alpha$ -αμινομάδας ενός αμινοξέος είναι στρατηγικής σημασίας κατά την πεπτιδική σύνθεση. Αυτός είναι και ο λόγος που σημαντικά βήματα έγιναν μόνο μετά την ανακάλυψη της βενζυλοξυ-καρβονυλο-ομάδας (Cbz ή Z-ομάδα) το 1932 από τους Bergman και Ζέρβα<sup>113</sup>. Η σταθερότητα της προστατευτικής ομάδας θεωρείται σημαντική, ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία διμερών ή ολιγομερών από μόρια του εκάστοτε προς σύζευξη αμινοξέος, με το τελικό ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της σύζευξης ολιγομερών στην πεπτιδική αλυσίδα. Επιπλέον, η  $\alpha$ -αμινο προστατευτική ομάδα πρέπει να απομακρύνεται εύκολα, ώστε να υπάρχει δυνατότητα για πλήρη και συνεχή επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας.

Για να επιτευχθεί η προστασία μιας αμινομάδας, η νουκλεοφιλικότητα του ατόμου του αζώτου της πρέπει να ελαττωθεί. Έτσι χρησιμοποιούνται ομάδες οι οποίες μειώνουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του N λόγω μεσομέρειας (π.χ. ουρεθανικού τύπου ομάδες) ή μέσω επαγωγικού φαινομένου (π.χ.  $\sigma$ -νιτροφαινυλσουλφενυλομάδα) και ομάδες που μειώνουν τη δραστικότητα της αμινομάδας λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης (π.χ. τριφαινυλμεθυλομάδα). Οι σημαντικότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες κατά την πεπτιδική σύνθεση Na-προστατευτικές ομάδες, καθώς και οι συνθήκες απομάκρυνσής τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.3**.

**Πίνακας 1.3:** α-Αμινο προστατευτικές ομάδες και οι συνθήκες απομάκρυνσής τους.

Όνομασία	Χημικός Τύπος	Σταθερότητα	Αποπροστασία
Βενζυλοξυκαρβονυλ-ομάδα <b>(Z-ομάδα)</b> <sup>114</sup>		Βασικές/ μερικώς όξινες συνθήκες	Pd/H <sub>2</sub> , HBr/HCl Σε διοξάνη
Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλ-ομάδα <b>(Boc-ομάδα)</b> <sup>115</sup>		Βασικές συνθήκες/καταλυτική υδρογόνωση	40% TFA, HF
2-(π-Διφαινυλο)-2- προπυλοξυ- καρβονυλ-ομάδα <b>(Broc-ομάδα)</b> <sup>116</sup>		Βασικές συνθήκες	1% TFA
9-φλουρενυλομεθοξυ- καρβονυλ-ομάδα <b>(Fmoc-ομάδα)</b> <sup>117-118</sup>		Όξινες συνθήκες/ καταλυτική υδρογόνωση	4N NaOH, 20-40% Piperidine/DMF
Τριφαινυλομεθυλ- ομάδα ή τριτυλομάδα <b>(Ttt-ομάδα)</b> <sup>116-117</sup>		Βασικές συνθήκες	~5% CH <sub>3</sub> COOH

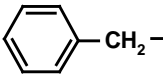
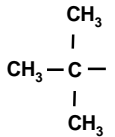
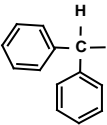
Τις πιο διαδεδομένες σήμερα προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας αποτελούν η Boc- και η Fmoc-ομάδα. Η πρώτη απομακρύνεται όπως αναφέρεται ανωτέρω σε όξινες συνθήκες, ενώ η δεύτερη με επίδραση βασικών διαλυμάτων. Η χρήση των ομάδων αυτών έχει άμεση σχέση με τη χρήση των πλευρικών δραστικών ομάδων των αμινοξέων (Ενότητες 1.4.2.γ και 1.4.3). Από τις δυο ανωτέρω προστατευτικές ομάδες η χρήση της Fmoc-ομάδας προτιμάται σήμερα κι είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των υποστρωμάτων ρεννίνης, λόγω των ήπιων συνθηκών που εφαρμόζονται καθόλη τη διάρκεια της σύνθεσης.

### 1.4.2.β Προστασία $\alpha$ -Καρβοξυλομάδας

Παρόλο που οι καρβοξυλομάδες των αμινοξέων δεν είναι τόσο δραστικά πυρηνόφιλα όσο οι αμινομάδες τους, η προστασία της  $\alpha$ -καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης σε διάλυμα είναι απαραίτητη, προκειμένου να καταστεί αδύνατη η προσβολή της από πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, όπως ελεύθερες αμινομάδες, κατά το στάδιο της σύζευξης. Αποδοτική, γι αυτό το σκοπό, είναι η εστεροποίηση του  $\alpha$ -καρβοξυλίου. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η διαλυτότητα των αμινοξέων στους οργανικούς διαλύτες και διευκολύνεται ο καθαρισμός των προϊόντων σύζευξης. Μετά το τέλος της σύνθεσης, και ενώ η N-τελική ομάδα παραμένει προστατευμένη, ο εστέρας σαπωνοποιείται αναγεννώντας το καρβοξύλιο. Σημαντική είναι η προστασία των πλευρικών καρβοξυλομάδων στα αμινοξέα G και D προς αποφυγή διακλαδισμένων πεπτιδίων - παραπροϊόντων.

Οι πιο συνηθισμένες ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της καρβοξυλομάδας παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.4**.

**Πίνακας 1.4:** Οι σημαντικότερες μονομερείς καρβοξυπροστατευτικές ομάδες.

Όνομασία	Χημικός Τύπος	Αποπροστασία
Βενζυλο- (Bzl) <sup>119</sup>		H <sub>2</sub> /Pd, HF, HBr/AcOH
Τριτοταγής βουτυλο- (tBu) <sup>120</sup>		TFA, ισχυρά οξέα
μεθυλο- (Me) αιθυλο- (Et) <sup>121</sup>	CH <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	Σαπωνοποίηση, αμμωνόλυση, υδραζινόλυση
Διφαινυλομεθυλο- (Dpm)		H <sub>2</sub> /Pd, TFA

#### 1.4.2.γ Προστασία πλευρικών (δραστικών) ομάδων αμινοξέων

Στην περίπτωση που τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται κατά την πεπτιδική σύνθεση φέρουν δραστικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες τους είναι απαραίτητο να ληφθεί πρόνοια για την προστασία τους, προκειμένου να αποφευχθεί η συμμετοχή τους σε ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό πρέπει να είναι σταθερές στα στάδια της σύνθεσης και να απομακρύνονται μετά το τέλος αυτής κάτω από συνθήκες που δεν επηρεάζουν το πεπτίδιο.

Η επιλογή των προστατευτικών πλευρικών ομάδων των αμινοξέων συσχετίζεται με την παροδική προστασία της  $\alpha$ -αμινομάδας τους (ορθογωνικότητα, ενότητα 1.4.3). Για το λόγο αυτό, οι πλευρικές προστατευτικές ομάδες χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι πλευρικές προστατευτικές ομάδες οι οποίες προσφέρουν ορθογωνικότητα με τη χρήση της Boc-ομάδας ως  $\alpha$ -αμινοπροστατευτικής (**Πίνακας 1.5A**). Η πιο χαρακτηριστική ομάδα πλευρικής προστασίας στην περίπτωση αυτή είναι η Βενζυλομάδα (Bzl) και η σύνθεση πεπτιδίων με τη χρήση της Boc- ομάδας ως  $\alpha$ -αμινοπροστατευτικής που αναφέρεται ως **Boc/Bzl** μεθοδολογία σύνθεσης. Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι ομάδες που προσφέρουν ορθογωνικότητα με τη χρήση της Fmoc-ομάδας ως  $\alpha$ -αμινοπροστατευτικής ομάδας με χαρακτηριστική την tButyl-ομάδα (**Πίνακας 1.5B**). Αντίστοιχα με τη Boc/Bzl μεθοδολογία, η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων με χρήση της Fmoc-αμινοπροστατευτικής ομάδας ονομάζεται **Fmoc/tButyl** μεθοδολογία. Στους **Πίνακες 1.5A-B** παρουσιάζονται τα αμινοξέα των οποίων οι πλευρικές ομάδες χρίζουν προστασίας, καθώς και οι ομάδες που χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση.

Πίνακας 1.5A: Προστασία πλευρικών ομάδων αμινοξέων (Boc/Bzl μεθοδολογία)

Όνομασία	Δομή	Προστασία Αμινοξέων	Σταθερότητα	Αποπροστασία
4-τολουολοσουλφονυλ-ομάδα ( <b>Tos</b> ) <sup>122</sup>		D/H	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TFMSA
2,4-Δινιτροφαινυλ-ομάδα ( <b>Dnp</b> ) <sup>123</sup>		H	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, Θειοφαινόλη/ DMF
Βενζυλοξυμεθυλ-ομάδα ( <b>Bom</b> ) <sup>124</sup>		H	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TFMSA, καταλυτική υδρογόνωση
2-Br-καρβοβενζοξυ-ομάδα ( <b>2-Br-Z</b> ) <sup>125</sup>		Υ	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TFMSA
Βενζυλομάδα ( <b>Bzl</b> )		S, W	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TFMSA
Φορμυλομάδα ( <b>For</b> )		W	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TMSOTf, 10%Pip /DMF
Ακεταμιδομεθυλ-ομάδα ( <b>Acm</b> )		C	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF
2-Cl-καρβοβενζοξυ-ομάδα ( <b>2-Cl-Z</b> ) <sup>126</sup>		K	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF, TFMSA
p-Μέθυλοβενζυλ-ομάδα ( <b>pMeBzl</b> )		C	Διαλ/τα Οξέων, TFA	HF



Πίνακας 1.5B: Προστασία πλευρικών ομάδων αμινοξέων (Fmoc/tButyl μεθοδολογία)

Όνομασία	Δομή	Προστασία Αμινοξέων	Σταθερότητα	Αποπροστασία
4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλο-φαινυλο-σουλφονυλ-ομάδα (Mtr) <sup>127</sup>		R	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη	~80% TFA
2,2,5,7,8-Πενταμεθυλοχρωμαν-6-σουλφονυλ-ομάδα (Pmc) <sup>128</sup>		R	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη	90% TFA
2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο-Διυδροβενζο-φουρανο-5-σουλφονυλο-μάδα (Pbf) <sup>129</sup>		R	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη	>90% TFA
Τριτοταγής Βουτυλοξυ-καρβονυλ-ομάδα (Boc)		H, K, W	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη	40% TFA
4-Μεθοξυ-τριτυλομάδα (Mmt) <sup>130-131</sup>		K	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη, Pd(0)	15% TFA
Τριτοταγής βουτυλοξυ-ομάδα (tBuO)		D, E	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη, Pd(0)	Διάλυμα TFA ή HCl/διοξάνη 4 N
Τριτοταγής βουτυλομάδα (tButyl) <sup>132</sup>		S, T, Y, C	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη, Pd(0)	Διάλυμα TFA ή HCl/διοξάνη 4 N
Τριτυλομάδα (Trt) <sup>130</sup>		S, T, R, N, C, Q, H	Πιπεριδίνη, Υδραζίνη, Pd(0)	TFA, ή Na/NH <sub>3</sub> ή BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O

### 1.4.3 Ορθογωνικότητα

Όταν οι δραστικές ομάδες ενός αμινοξέος είναι προστατευμένες ανεξάρτητα η μία από την άλλη, δηλαδή η αποπροστασία της μιας δεν επηρεάζει την άλλη, τότε αναφερόμαστε σε ορθογωνική προστασία. Για παράδειγμα η προστασία του ινδολικού δακτυλίου της θρυπτοφάνης με την Boc-ομάδα με παράλληλη προστασία της  $\alpha$ -αμινομάδας με την Fmoc-ομάδα αποτελούν ορθογωνική προστασία, γιατί η κάθε μια μπορεί να απομακρυνθεί σε συνθήκες οι οποίες δεν επηρεάζουν την άλλη. Επιπλέον για δύο ομάδες οι οποίες απομακρύνονται με παρόμοιες συνθήκες δηλαδή δεν προσφέρουν ορθογωνική προστασία σε ειδικές περιπτώσεις δύναται να επιτευχθεί εκλεκτική απομάκρυνση της μιας από τις δύο. Παράδειγμα αποτελεί η εκλεκτική απομάκρυνση της 4-μεθοξυ-τριφαινυλο-μέθυλομάδας (Mmt) παρουσία της τριφαινυλομεθυλομάδας (Ttt), λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της πρώτης έναντι των όξινων αντιδραστηρίων.

### 1.4.4 Μέθοδοι σύζευξης (Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού, είναι ενδόθερμη αντίδραση και κατά συνέπεια απαιτείται ενέργεια για να επιτελεσθεί. Έτσι για τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού σε ήπιες συνθήκες (χαμηλή θερμοκρασία) είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της  $\alpha$ -καρβοξυλομάδας του προστιθέμενου αμινοξέος, ώστε να δεχτεί τη πυρηνόφιλη προσβολή από την ελεύθερη αμινομάδα του C-τελικού αμινοξέος.

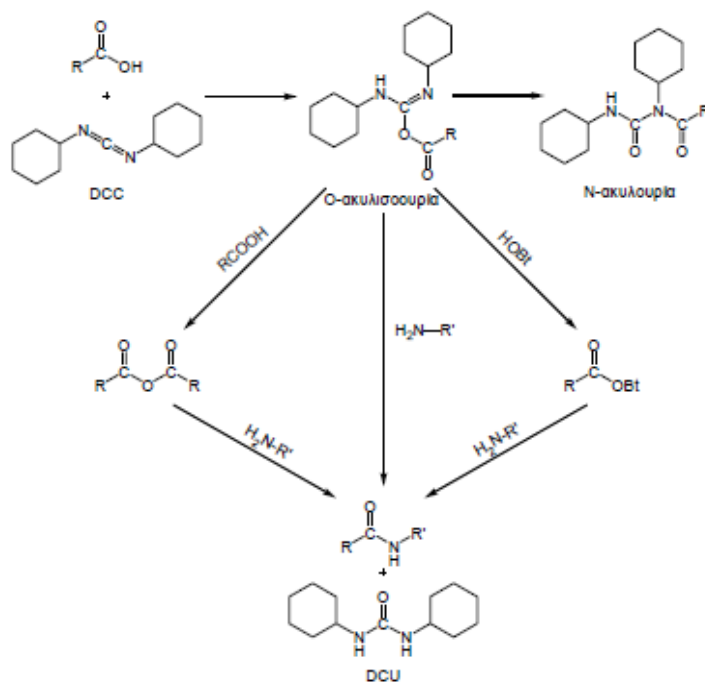
Η ενεργοποίηση της  $\alpha$ -καρβοξυλομάδας επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης και η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί στοχεύει στην δημιουργία πεπτιδικού δεσμού γρήγορα, με υψηλή απόδοση, χωρίς παράπλευρες αντιδράσεις και κυρίως να μειωθεί στο ελάχιστο η ρακεμίωση. Οι πιο γνωστές μέθοδοι σύζευξης που χρησιμοποιούνται αναπτύσσονται παρακάτω ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίδεται στη μεθοδολογία των μεικτών ανυδριτών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

#### 1.4.4.α Μέθοδος των Καρβοδιιμιδίων

Τα καρβοδιιμίδια είναι από τα πιο δημοφιλή *in situ* αντιδραστήρια ενεργοποίησης στην πεπτιδική σύνθεση. Ο κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC)<sup>133-134</sup>. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.13**, ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την προσθήκη του N-προστατευμένου αμινοξέος στο DCC, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ενεργού ενδιάμεσου Ο-ακυλισοουρίας<sup>135-137</sup>. Η εξαιρετικά δραστική αυτή ένωση είναι δυνατό να υποστεί πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινοσυστατικό, οδηγώντας στο σχηματισμό του πεπτιδίου. Εναλλακτικά, δύναται να δημιουργήσει ενεργοποιημένα καρβοξυ-παράγωγα (προσθήκη ενός ακόμη ισοδύναμου του καρβοξυ-συστατικού ή μιας πυρηνόφιλης υδροξυλαμινικής ένωσης), όπως συμμετρικούς ανυδρίτες ή ενεργούς εστέρες, αλλά και να υποστεί ενδομοριακό μετασχηματισμό προς N-ακυλουρία, μειώνοντας έτσι την τελική απόδοση.

Επίσης, σε όλες τις αντιδράσεις της Ο-ακυλισοουρίας σχηματίζεται ως βασικό παραπροϊόν η N,N'-δικυκλοεξυλουρία (DCU), η οποία αν και αδρανής, διαχωρίζεται πολλές φορές δύσκολα από το προϊόν της σύζευξης<sup>138-139</sup>. Τα προβλήματα αυτά περιορίζονται με την χρήση καρβοδιιμιδίων, των οποίων η ουρία είναι πιο ευδιάλυτη στους οργανικούς διαλύτες, όπως είναι το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC).

Το πρόβλημα του σχηματισμού N-ακυλουρίας καθώς και η ρακεμίωση του καρβοξυσυστατικού περιορίζονται με τη χρήση πρόσθετων πυρηνόφιλων αντιδραστηρίων, το δημοφιλέστερο εκ των οποίων είναι το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt)<sup>140-141</sup>, καθώς και το 7-αζα-παράγωγό του (HOAt). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί το N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (HOSu)<sup>142</sup> και η 3-υδροξυ-4-οξο-3,4-διυδρο-1,2,3-βενζοτρίαζίνη (HOObt)<sup>143</sup>. Τα αντιδραστήρια αυτά προσβάλουν το ενεργό ενδιάμεσο Ο-ακυλισοουρία, σχηματίζοντας ενεργούς εστέρες, οι οποίοι είναι λιγότερο επιρρεπείς σε παράπλευρες αντιδράσεις, αλλά αρκετά δραστικοί ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητικό ποσοστό ακυλίωσης.



Σχήμα 1.13: Μηχανισμός σύζευξης με DCC.

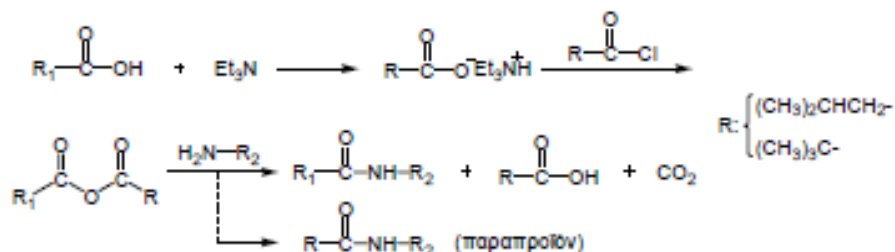
#### 1.4.4.β Μέθοδος των Ανυδριτών

Η χρησιμοποίηση συμμετρικών και μικτών ανυδριτών των  $N^{\alpha}$ -προστατευμένων αμινοξέων ή πεπτιδίων, ως ενεργοποιημένα καρβοξυ-παράγωγα, βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην πεπτιδική σύνθεση. Η πρώτη αναφορά στη χρησιμοποίησή τους χρονολογείται πριν από 100 και πλέον χρόνια από τον Curtius<sup>144</sup>. Ωστόσο, ο Wieland ήταν αυτός που πρωτοεφάρμοσε τη μέθοδο στη σύνθεση πεπτιδίων<sup>145</sup>.

Οι **συμμετρικοί ανυδρίτες** παρασκευάζονται με επίδραση DCC σε διάλυμα του αντίστοιχου  $N^{\alpha}$ -προστατευμένου αμινοξέος<sup>146-147</sup>. Αν και οι συμμετρικοί ανυδρίτες αποτελούν ισχυρότατα ακυλιωτικά μέσα, η μέθοδος παρουσιάζει προβλήματα που σχετίζονται με τη ρακεμίωση που προκαλείται από τη χρησιμοποίηση DCC, καθώς και με το γεγονός ότι η μισή ποσότητα του  $N^{\alpha}$ -προστατευμένου αμινοξέος που αρχικά χρησιμοποιείται παραμένει αναξιοποίητη.

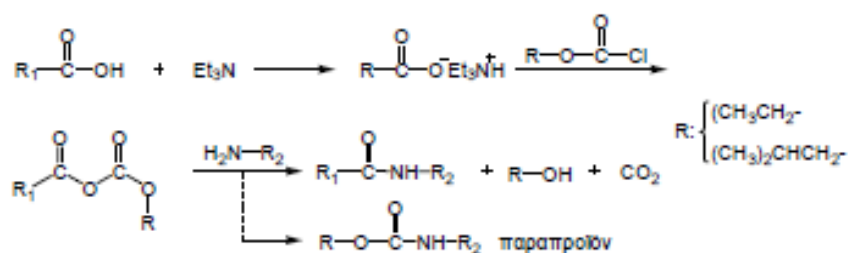
Προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά αναπτύχθηκε η μέθοδος των **ασύμμετρων ή μικτών ανυδριτών** με άλλα οξέα. Αυτοί σχηματίζονται με την επίδραση του χλωριδίου ενός καρβοξυλικού οξέος (βοηθητικό) σε άλας του  $N^{\alpha}$ -προστατευμένου αμινοξέος με τριτοταγή βάση (συνήθως τριαιθυλαμίνη) σε χαμηλή θερμοκρασία ( $-15^{\circ}\text{C}$  έως  $0^{\circ}\text{C}$ ). Πρόβλημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το

μόριο του ανυδρίτη περιέχει δύο ηλεκτρονιόφιλες καρβονυλικές ομάδες, κάθε μία από τις οποίες μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ακυλίωσης. Προκειμένου η ακυλίωση να γίνεται εκλεκτικά, χρησιμοποιούνται παράγωγα στερεοχημικά παρεμποδισμένων καρβοξυλικών οξέων, όπως χλωρίδια του ισοβαλεριανικού ή του πιβαλικού οξέος (Σχήμα 1.14) <sup>148</sup>.



**Σχήμα 1.14:** Σύζευξη με την μέθοδο των μικτών ανυδριτών.

Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χρησιμοποίηση περίσσειας βάσης, για τη δέσμευση του βοηθητικού καρβοξυλικού οξέος που απελευθερώνεται, συνθήκες κάτω από τις οποίες ευνοείται η ρακεμίωση. Για τον λόγο αυτό ήταν πολύ σημαντική προσφορά στην πεπτιδική σύνθεση η εισαγωγή των **μικτών καρβονικών ανυδριτών**. Αποτελούν την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικτών ανυδριτών. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιούνται συνήθως ακυλοχλωρίδια με ογκώδεις αλκυλομάδες, όπως ο χλωρομυρμηκικός αιθυλεστέρας<sup>149</sup> και ο χλωρομυρμηκικός ισοβουτυλεστέρας<sup>150</sup>. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται ο ηλεκτρόφιλος χαρακτήρας του ατόμου του άνθρακα που συνδέεται με απλό δεσμό με τα δύο οξυγόνα, έτσι ώστε η πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινο-συστατικό να πραγματοποιείται στην επιθυμητή θέση. Κατά τη σύζευξη με τη μέθοδο των μικτών καρβονικών ανυδριτών αποφεύγεται η χρησιμοποίηση περίσσειας βάσης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αφού παράγονται ως παραπροϊόντα διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη που απομακρύνονται εύκολα (Σχήμα 1.15).



**Σχήμα 1.15:** Σύζευξη με την μέθοδο των μικτών καρβονικών ανυδριτών.

### 1.4.4.γ Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων

Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, τα ενεργοποιημένα καρβοξυπαράγωγα είναι εστέρες των N<sup>α</sup>-προστατευμένων αμινοξέων. Οι ενεργοί εστέρες παρασκευάζονται συνήθως με επίδραση DCC σε μίγμα του N<sup>α</sup>-προστατευμένου αμινοξέος και της κατάλληλης αλκοόλης. Οι αλκοόλες που χρησιμοποιούνται περιέχουν ομάδες που έλκουν ηλεκτρόνια και ταυτόχρονα απομακρύνονται εύκολα από τους εστέρες. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται ενεργοποιημένα καρβοξυπαράγωγα στα οποία η πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινοσυστατικό μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την δημιουργία παράπλευρων αντιδράσεων. Οι ενεργοί εστέρες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση και οι κυριότεροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.6**.

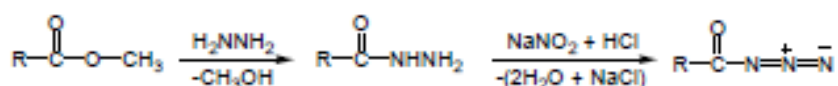
**Πίνακας 1.6:** Ενεργοί εστέρες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση

Όνομα (Σύντμηση)	Συντακτικός Τύπος
π-νιτροφαινυλεστέρες <b>ONp</b> <sup>151</sup>	
2,4,5- τριχλωροφαινυλεστέρες <b>OTcp</b> <sup>152</sup>	
πενταχλωροφαινυλεστέρες <b>Orcp</b> <sup>153</sup>	
πενταφθοροφαινυλεστέρες <b>Orfp</b> <sup>154</sup>	
1-υδροξυ-βενζοτρίαζολυλεστέρες <b>Obt</b> <sup>155</sup>	

Πολλοί όμως ενεργοί εστέρες έχουν το μειονέκτημα του μεγάλου κινδύνου ρακεμίωσης του καρβοξυπαραγώγου, στην διάρκεια της παρασκευής και αμινόλυσής τους. Ο κίνδυνος αυτός είναι σημαντικά μειωμένος στις περιπτώσεις των υδροξυηλεκτριμιδικών και υδροξυβενζοτριαζολυλεστέρων.

#### 1.4.4.δ Μέθοδος των Αζιδίων

Η μέθοδος των αζιδίων εισήχθηκε στην πεπτιδική σύνθεση το 1902 από τον Curtius<sup>156</sup> και σήμερα χρησιμοποιείται περιορισμένα κυρίως στη σύζευξη πεπτιδικών κλασμάτων. Αρχικά, τα Na-προστατευμένα αμινοξέα ή πεπτιδικά κλάσματα μετατρέπονται σε υδραζίδια και τελικά σε αζίδια αντιδρώντας με νιτρώδη παράγωγα.



**Σχήμα 1.16:** Σύζευξη με την μέθοδο των αζιδίων.

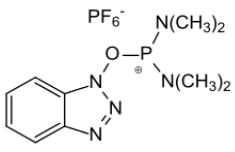
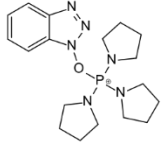
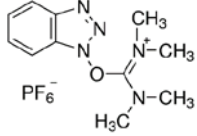
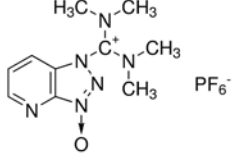
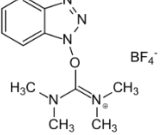
Τα αζίδια είναι ασταθή και δεν απομονώνονται εύκολα, αλλά αντιδρούν *in situ* με το αμινοσυστατικό αμέσως μετά την παρασκευή τους, σχηματίζοντας πεπτιδικό δεσμό.

#### 1.4.4.ε Μέθοδος φωσφονικών και ουρονικών παραγώγων

Τα τελευταία χρόνια στη πεπτιδική χημεία χρησιμοποιούνται για *in situ* αντιδράσεις μέσω OButyl-εστέρων, κυρίως φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν (σταθερότητα, χρήση τους σε υγρή και στερεά φάση, διεξαγωγή της αντίδρασης σε ένα στάδιο).

Μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.7**.

**Πίνακας 1.7:** Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Όνομασία (Σύντμηση)	Συντακτικός Τύπος
Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ-τρις(διμεθυλαμινο)-φωσφονίου <b>(BOP)</b> <sup>157</sup>	
Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ-τρις-πυρρολιδινο-φωσφονίου <b>(PyBOP)</b> <sup>158</sup>	
Εξαφωσφορικό άλας της 2-(1H βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας <b>(HBTU)</b> <sup>159</sup>	
Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας <b>(HATU)</b> <sup>160-161</sup>	
Τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1H βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας <b>(TBTU)</b> <sup>160</sup>	

Τα αντιδραστήρια αυτά αντιδρούν μόνο με καρβοξυλικά ανιόντα γι' αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη μιας βάσης στο μίγμα της αντίδρασης όπως διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) ή με καλύτερα αποτελέσματα κολλιδίνη. Όμως, οι βασικές συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η ενεργοποίηση και η σύζευξη, αυξάνουν τον κίνδυνο ρακεμίωσης μέσω αζλακτόνης. Πρόσθετα για μείωση της ρακεμίωσης χρησιμοποιούνται HOBt ή HOAt τα οποία και πρωτονιώνουν τη σχηματιζόμενη αζλακτόνη.

Η χρησιμοποίηση ακυλοφωσφονικών αλάτων, ως ενεργών ενδιάμεσων για το σχηματισμό αμιδικού δεσμού, αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1969<sup>162</sup>. Ωστόσο, ενώσεις που προάγουν την πεπτιδική σύνθεση μέσω του σχηματισμού ακυλοφωσφονικών



αλάτων άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρύτατα αφού ο Castro εισήγαγε το 1975 τη χρησιμοποίηση του εξαφθοροφωσφορικού άλατος του βενζοτριαζολυλοξυ-τρεις(διμεθυλαμινο)φωσφονίου (BOP)<sup>157</sup>. Επίσης, έχει αναπτυχθεί η χρησιμοποίηση των αντίστοιχων ουρονικών αλάτων, ιδιαίτερα στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση. Σ' αυτήν την περίπτωση οι δραστικές ενδιάμεσες ενώσεις σχηματίζονται ταχύτατα, ενώ περιορίζονται αποτελεσματικά παράπλευρες αντιδράσεις, όπως η ρακεμίωση και η αφυδάτωση των αμιδικών πλευρικών ομάδων αμινοξέων όπως η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη.

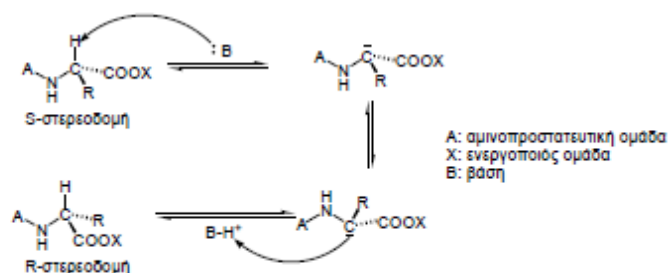
### 1.4.5 Ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά την πεπτιδική σύνθεση

Κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι δυνατό να προκύψουν προβλήματα που αφορούν είτε τη δημιουργία παραπροϊόντων, είτε την απώλεια της οπτικής καθαρότητας των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται. Τα σημαντικότερα από αυτά, όπως και οι τρόποι αντιμετώπισής τους, παρουσιάζονται στη συνέχεια.

#### 1.4.5.α Ρακεμίωση

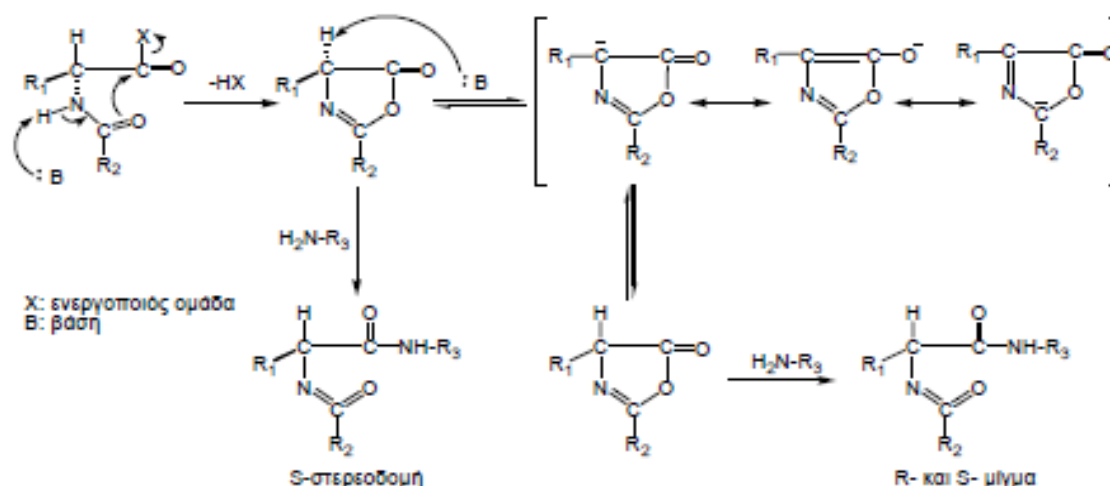
Η ρακεμίωση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα κατά την ενεργοποίηση και τη σύζευξη παρουσία βάσης. Ο διαχωρισμός των διαστερεοϊσομερών είναι δύσκολος και η απώλεια της οπτικής καθαρότητας μεταβάλλει τη βιολογική δράση του πεπτιδίου. Ο βαθμός της ρακεμίωσης εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων, όπως την μέθοδο ενεργοποίησης, την χρησιμοποιούμενη N-προστατευτική ομάδα και τις συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία, διαλύτη). Δύο βασικοί μηχανισμοί οδηγούν σε ρακεμίωση:

**1) Ρακεμίωση Μέσω Απόσπασης α-Πρωτονίου:** Το όξινο υδρογόνο του ασύμμετρου ατόμου άνθρακα αποσπάται υπό την επίδραση βάσης (συνήθως τριτοταγούς αμίνης) προς παραγωγή καρβανιόντος. Η επαναπρόσληψη από το καρβανιόν του πρωτονίου, από την πρωτονιωμένη αμίνη, συμβαίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε να λαμβάνεται μίγμα R και S οπτικών αντιπόδων του αμινοξέος (**Σχήμα 1.17**).



**Σχήμα 1.17:** Μηχανισμός ρακεμίσωσης μέσω απόσπασης  $\alpha$ -πρωτονίου υπό την επίδραση βάσης.

II) *Ρακεμίσωση Μέσω Σχηματισμού Αζλακτόνης [5-(4<sup>H</sup>)-Οξαζολόνης]:* Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει το σχηματισμό οξαζολόνης από κυκλοποίηση ενεργοποιημένων ακυλο-αμινοξέων και πεπτιδίων, η οποία μπορεί να δεχθεί πυρηνόφιλη προσβολή από ελεύθερη αμινομάδα οδηγώντας σε οπτικά καθαρό προϊόν ή να υποστεί απόσπαση πρωτονίου από τη βάση δημιουργώντας ρακεμικό μίγμα<sup>163</sup>.

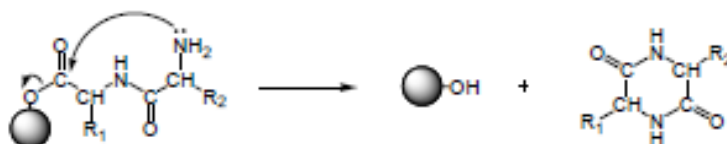


**Σχήμα 1.18:** Μηχανισμός ρακεμίσωσης μέσω σχηματισμού οξαζολόνης υπό την επίδραση βάσης

Αμινοξέα που φέρουν ηλεκτραρνητική ομάδα σε θέση  $\beta$ , όπως είναι η S, T, C και το D καθώς και τα αρωματικά αμινοξέα, είναι τα πιο επιρρεπή στη ρακεμίσωση, αφού η παρουσία της ηλεκτραρνητικής ομάδας διευκολύνει την απόσπαση πρωτονίου από το  $\alpha$ -άτομο άνθρακα<sup>141,164</sup>. Επίσης, οι αμινοπροστατευτικές ομάδες ουρεθανικού τύπου (Z-, Boc-, Fmoc- κ.α) ελαχιστοποιούν την έκταση της ρακεμίσωσης, σε αντίθεση με τις ακυλομάδες (Ac- κ.α) που ευνοούν το σχηματισμό αζλακτόνης.

### 1.4.5.β Σχηματισμός Δικετοπιπεραζινών

Στο στάδιο της αποπροστασίας της α-αμινομάδας του διπεπτιδίου είναι δυνατό να σχηματιστεί ως παραπροϊόν δικετοπιπεραζίνη. Συγκεκριμένα, οι εστέρες των διπεπτιδίων (εφόσον η πεπτιδική αλυσίδα συνδέεται με τη ρητίνη μέσω εστερικού δεσμού όταν η σύνθεση γίνεται σε στερεή φάση) υφίστανται αυθόρμητη κυκλοποίηση και παράγουν 2,5- δικετοπιπεραζίνες, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.19**.



**Σχήμα 1.19:** Μηχανισμός σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης κατά τη σύνθεση σε στερεή φάση

Η ενδομοριακή αυτή τροποποίηση ευνοείται ιδιαίτερα όταν στο διπεπτίδιο περιέχονται τα αμινοξέα γλυκίνη ή προλίνη. Τέλος ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης ευνοείται όταν στο διπεπτίδιο συμμετέχει αμινοξύ με D-διαμόρφωση<sup>165</sup>. Η χρησιμοποίηση υψηλών συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων κατά την πεπτιδική σύνθεση αυξάνουν την ταχύτητα της επιθυμητής αντίδρασης σύζευξης και μειώνουν το βαθμό της κυκλοποίησης.

### 1.4.6 Στρατηγικές της πεπτιδικής σύνθεσης

Η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας κατά τη σύνθεση ενός πεπτιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη σταδιακή προσθήκη ενός αμινοξέος κάθε φορά (step by step), είτε με συμπύκνωση πεπτιδικών κλασμάτων (fragment condensation). Κατά την πρώτη μέθοδο, η σύνθεση λαμβάνει χώρα από το C-τελικό προς το N-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας και επαναλαμβάνονται τα στάδια της προσθήκης ενός κάθε φορά N<sup>α</sup>-προστατευμένου αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα και της απομάκρυνσης της αμινοπροστατευτικής του ομάδας. Η εν λόγω στρατηγική δεν ενδείκνυται για την σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων και πρωτεϊνών λόγω της μειωμένης καθαρότητας του τελικού προϊόντος.

Σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων ή πρωτεϊνών βρίσκει εφαρμογή η μέθοδος της συμπύκνωσης πεπτιδικών κλασμάτων.

Σύμφωνα με αυτή, συντίθενται αρχικά μικρότερες αλληλουχίες αμινοξέων, που αποτελούν κομμάτια της επιθυμητής ένωσης, τα οποία συζευγνύονται τελικά προς σχηματισμό του τελικού πεπτιδίου. Η διαδικασία σ' αυτή την περίπτωση είναι ταχύτερη, αφού προσφέρεται η δυνατότητα παράλληλης σύνθεσης τμημάτων της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά υπάρχει κίνδυνος ρακεμίωσης του ενεργοποιημένου C-τελικού αμινοξέος στο καρβοξυπαράγωγο, εκτός αν είναι P (οπτικά σταθερή) και G (οπτικά αδρανής).

### 1.4.7 Τεχνικές της πεπτιδικής σύνθεσης

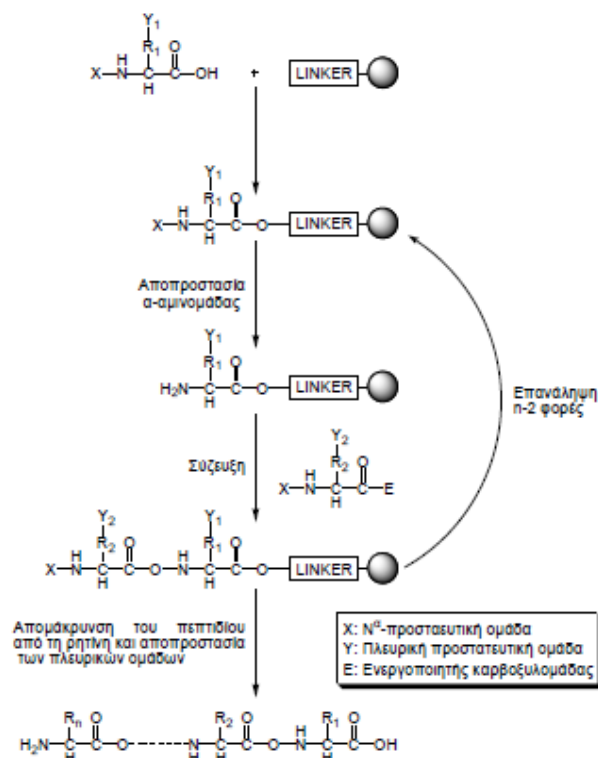
Η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε υγρή, είτε σε στερεή φάση. Και οι δύο τεχνικές αναλύονται στη συνέχεια, ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση.

#### 1.4.7.α Πεπτιδική Σύνθεση σε Υγρή Φάση

Η σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση αποτελεί την κλασσική μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης και αυτή που πρωτοεφαρμόστηκε. Ονομάζεται έτσι επειδή όλη η συνθετική διαδικασία λαμβάνει χώρα σε διάλυμα. Η σταδιακή επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας προϋποθέτει τον καθαρισμό όλων των ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία παίρνουν μέρος στα επόμενα στάδια της σύνθεσης. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με ανακρυσταλλώσεις, εκχυλίσεις ή χρωματογραφικά και πρόκειται για μία πολύ επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Το γεγονός αυτό αποτελεί και το βασικότερο μειονέκτημα της σύνθεσης σε διάλυμα, όπως επίσης και τα προβλήματα διαλυτότητας που είναι δυνατό να παρουσιαστούν κατά την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Εξαιτίας των παραπάνω, η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου συνιστάται για τη σύνθεση μικρών πεπτιδίων (<15 αμινοξέα). Στα πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε διάλυμα συγκαταλέγονται τόσο η παρασκευή ομογενούς προϊόντος, η δυνατότητα απομόνωσης και καθαρισμού των ενδιάμεσων προϊόντων και το χαμηλό κόστος των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων. Η μεγάλη σημασία αυτής της τεχνικής αντανακλάται από το γεγονός ότι τα περισσότερα δραστικά συστατικά φαρμάκων πεπτιδικής φύσης παρασκευάζονται βιομηχανικά με αυτή την μέθοδο.

### 1.4.7.β Πεπτιδική Σύνθεση σε Στερεή Φάση

Η μέθοδος της σύνθεσης σε στερεά φάση αποτελεί σταθμό στην πεπτιδική χημεία. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Merrifield το 1963 και αφορούσε την σύνθεση του εννεαπεπτιδίου βραδυκινίνη<sup>166</sup>. Αρχικά έχουμε ομοιοπολική δέσμευση του C-τελικού αμινοξέος σε μια χαρακτηριστική ομάδα ενός αδιάλυτου στερεού υποστρώματος (πολυμερές). Οι δραστικές ομάδες των αμινοξέων είναι προστατευμένες με ειδικές ομάδες, οι οποίες δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες της αντίδρασης. Στη συνέχεια έχουμε επαναλαμβανόμενες διεργασίες σύζευξης με το επόμενο αμινοξύ και απομάκρυνση της N<sup>α</sup>-προστατευτικής του ομάδας. Στο τέλος της σύνθεσης, το προϊόν αποδεσμεύεται από τη ρητίνη και όλες τις προστατευτικές ομάδες και μπορεί να ταυτοποιηθεί.



**Σχήμα 1.20:** Γενικό σχήμα σύνθεσης πεπτιδίου σε στερεή φάση.

Στα πλεονεκτήματα της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση συγκαταλέγονται η ταχύτητα, η απόδοση των αντιδράσεων, η αποφυγή προβλημάτων διαλυτότητας, ειδικότερα κατά τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου. Βασικό μειονέκτημα κατά την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί η αδυναμία απομόνωσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των ενδιάμεσων προϊόντων. Ως εκ τούτου, το τελικό προϊόν συνοδεύεται από μικροποσότητες παραπροϊόντων

που έχουν δημιουργηθεί καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής διαδικασίας και αφορούν ως επί το πλείστον μικρότερα πεπτίδια, ο σχηματισμός των οποίων οφείλεται σε ατελείς αντιδράσεις σύζευξης και αποπροστασίας. Επομένως, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος.

## 1.5.Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

### 1.5.1 Εισαγωγή

Η **Ενζυμική Κινητική**, ως τμήμα της Ενζυμολογίας, μελετά τους ενζυμικούς μηχανισμούς, τις συνθήκες και τις ταχύτητες των ενζυμικών αντιδράσεων και κατατάσσεται συστηματικά στην κινητική των καταλυόμενων χημικών αντιδράσεων. Οι ιδιαιτερότητές της προκύπτουν μόνο από τη μακρομοριακή φύση του καταλύτη, που είναι φυσική πρωτεΐνη από διάφορους οργανισμούς (ένζυμο).

Έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες<sup>167</sup>:

- (α) Την συγκέντρωση του υποστρώματος
- (β) Την συγκέντρωση του ενζύμου
- (γ) Την θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ενζυμική αντίδραση
- (δ) Την τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης
- (ε) Την παρουσία διαφόρων ενζυμικών ή μη ενζυμικών τροποποιητών (όπως π.χ. αναστολέων, ενεργοποιητών κτλ.)

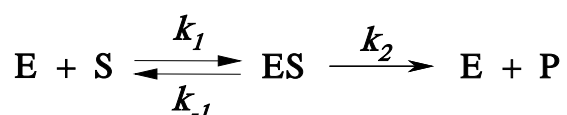
Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, ως συνάρτηση πολλών παραμέτρων είναι η μαθηματική έκφραση της καταλυτικής διαδικασίας σε όρους σταθερών ταχύτητας και συγκεντρώσεων των αντιδρώντων. Η ενζυμική κινητική αποτελεί μερική περίπτωση της χημικής κινητικής. Επομένως, η επίδραση των ενζύμων μειώνει την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης κατά τη μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα. Η διαφορά επιπέδων ελεύθερης ενέργειας μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων μιας αντίδρασης έχει μια τιμή  $\Delta G^0$ , που δεν αλλάζει με τη παρουσία του ενζύμου. Εκείνο που αλλάζει είναι η ενέργεια ενεργοποίησης  $\Delta G^\ddagger$ .

### 1.5.2 Εξίσωση Michaelis - Menten

Η πρώτη γενική εξίσωση ταχύτητας για ενζυμικές αντιδράσεις διατυπώθηκε από τον Henri, το 1902<sup>168</sup>. Πρώτος αυτός, παρατήρησε ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής

αντίδρασης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του ενζύμου  $[E]_0$  και αυξάνεται μη γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος  $[S]$  ως μια μέγιστη τιμή.

Ο Henri βασίστηκε στην υπόθεση ότι μια ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια (δεύτερο στάδιο) διασπάται προς ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα κατά το σχήμα αντίδρασης **1.21**. Έτσι, έγινε μια πρώτη προσπάθεια να παραχθεί μια εξίσωση που να δίνει την μεταβολή της ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος, σημαντικού παράγοντα που καθορίζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.



**Σχήμα 1.21:** Απλός μηχανισμός δύο σταδίων (Henri-Michaelis-Menten)

- όπου
- E** είναι το ένζυμο
  - S** το υπόστρωμα
  - ES** το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος
  - P** το προϊόν ή τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης
  - $k_1$ ,  $k_{-1}$ , και  $k_2$  οι σταθερές ταχύτητας των στοιχειωδών αντιδράσεων

Λίγα χρόνια αργότερα, οι Michaelis και Menten<sup>169</sup> επιβεβαίωσαν πειραματικά τις θεωρητικές προτάσεις του Henri. Μάλιστα, πρότειναν μια νέα ελαφρώς τροποποιημένη εξίσωση η οποία δίνει την μεταβολή της ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος και έγινε γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten ή εξίσωση Henri-Michaelis-Menten. Από τότε, η εξίσωση των Michaelis-Menten έγινε ευρέως αποδεκτή και μέχρι σήμερα αποτελεί την βασική εξίσωση της ενζυμικής κινητικής. Η θεωρητική βάση στην οποία στηρίχθηκαν οι Michaelis και Menten για την παραγωγή της εξίσωσης τους είναι ίδια με αυτήν στην οποία στηρίχθηκε ο Henri και ονομάστηκε “**θεωρία της σταθερής κατάστασης**”. Σύμφωνα με αυτήν, αμέσως μόλις αρχίζει η αντίδραση, δημιουργείται μια σταθερή κατάσταση (steady state) τέτοια ώστε ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης του συμπλόκου **ES**, σε συνάρτηση με το χρόνο, να είναι στην ουσία μηδέν όταν συγκρίνεται με το ρυθμό μεταβολής της

συγκέντρωσης των ενώσεων που αντιδρούν αλλά και των προϊόντων που προκύπτουν, δηλαδή  $\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$ <sup>170</sup>.

Η εξίσωση (1.1) είναι η μαθηματική εξίσωση, που περιγράφει τη σχέση μεταξύ της ταχύτητας  $v$  μιας ενζυμικής αντίδρασης και της συγκέντρωσης  $[S]$  του υποστρώματος και είναι γνωστή ως **εξίσωση Michaelis-Menten**.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.1)$$

όπου  $V_{\max}$  είναι η μέγιστη ταχύτητα στην οποία μπορεί να φθάσει θεωρητικά η ενζυμική αντίδραση

$K_m$  μια παράμετρος που καλείται σταθερά Michaelis-Menten

Η παραγωγή της εξίσωσης Michaelis-Menten βασίστηκε στο σχήμα αντίδρασης (1.24) και στις υποθέσεις:

- (1) Στη διάρκεια της αντίδρασης ισχύουν οι σχέσεις  $[E]_0 \ll [S]$  και  $[E]_0 = [E] + [ES]$ , (όπου  $[E]$  η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου ενζύμου)
- (2) Λίγο μετά την έναρξη της αντίδρασης, αποκαθίσταται η σταθερή κατάσταση ( $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ )
- (3) Η ταχύτητα της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση  $v = k_2 [ES]$

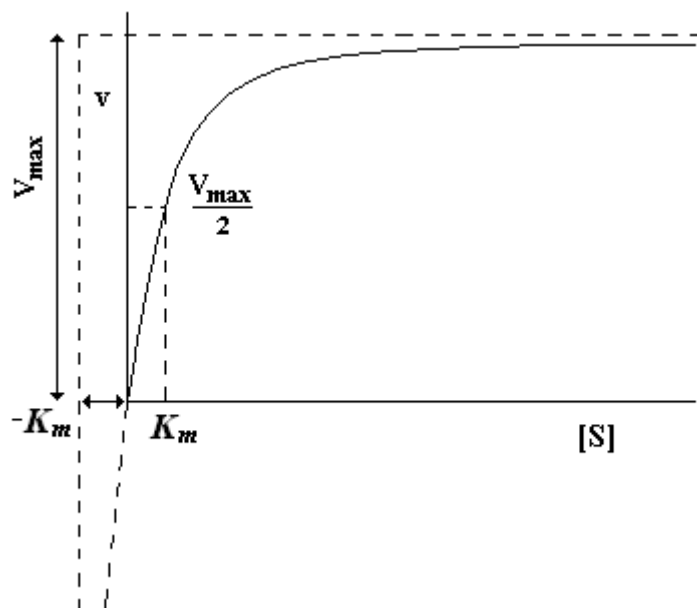
Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να γράψουμε τις εξισώσεις (α) και (β), από όπου με αντικατάσταση στις σχέσεις  $[E]_0 = [E] + [ES]$  και  $v = k_2 [ES]$  καταλήγουμε στην εξίσωση (γ), όπου  $K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$  και  $V_{\max} = k_2[E]_0$ . Η σταθερά ταχύτητας  $k_2$ , στον προηγούμενο τύπο, αναφέρεται και ως  $k_{cat}$ .

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad (\alpha) \quad [E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[ES]}{k_1[S]} \quad (\beta)$$

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]} \quad \text{ή} \quad v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \quad (\gamma)$$

Πρόκειται για την εξίσωση μιας ορθογώνιας υπερβολής. Οι τιμές των παραμέτρων  $V_{\max}$  και  $K_m$  αντιστοιχούν προς τις αποστάσεις των αξόνων  $v$  και  $[S]$  από τις ασύμπτωτες της υπερβολής, αντίστοιχα (**Σχήμα 1.22**).





Σχήμα 1.22: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης Michaelis-Menten.

### 1.5.3 Η σημασία των παραμέτρων Michaelis-Menten

#### 1.5.3.α Η έννοια της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ . Η σταθερά εξειδίκευσης

Προηγουμένως τονίστηκε ιδιαίτερα ότι η ταχύτητα της αντίδρασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος δίνεται από τον τύπο  $v = (k_{cat}/K_m)[E]_0[S]$ . Δηλαδή η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  είναι μια φαινόμενη σταθερά ταχύτητας δευτέρας τάξης. Ωστόσο, αυτή δεν είναι μια αληθής μικροσκοπική σταθερά ταχύτητας, εκτός από την ακραία περίπτωση όπου το στάδιο που ρυθμίζει την αντίδραση είναι η σύμπλεξη ενζύμου και υποστρώματος.

Η σπουδαιότητα της  $k_{cat}/K_m$  είναι ότι συσχετίζει την ταχύτητα της αντίδρασης προς την συγκέντρωση του ελεύθερου παρά του ολικού ενζύμου. Αυτό φαίνεται εύκολα από την σχέση  $v = (k_{cat}/K_m)[E]_0[S]$ , αφού σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος το ένζυμο είναι ευρέως μη-δεσμευμένο και ισχύει η σχέση  $[E] \approx [E]_0$ . Σε τέτοιες συγκεντρώσεις, η ταχύτητα της αντίδρασης δίνεται από την σχέση  $v = (k_{cat}/K_m)[E]_0[S]$ .

Επίσης, η παραπάνω σχέση ισχύει για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος, ενώ όπως προαναφέραμε η  $k_{cat}/K_m$  καλείται και ως *σταθερά εξειδίκευσης*, λόγω του ότι προσδιορίζει την εξειδίκευση για ανταγωνιστικά υποστρώματα. Η τιμή της  $k_{cat}/K_m$  δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από την τιμή οποιασδήποτε άλλης σταθεράς ταχύτητας δευτέρας τάξης της αντίδρασης, προς τα προϊόντα. Έτσι η  $k_{cat}/K_m$  θέτει ένα χαμηλότερο όριο για την σταθερά πρόσδεσης ενζύμου και υποστρώματος.

- ✓ **κανόνας:** Η  $k_{cat}/K_m$  είναι μια φαινόμενη σταθερά ταχύτητας δευτέρας τάξης, η οποία αναφέρεται στις ιδιότητες και τις αντιδράσεις του ελεύθερου ενζύμου με το ελεύθερο υπόστρωμα.<sup>171</sup>

### 1.5.3.β Η έννοια της $K_m$ . Πραγματικές και φαινόμενες σταθερές ισορροπίας

Αν και ισχύει μόνο για τον μηχανισμό Michaelis-Menten ή για όμοιες καταστάσεις ότι  $K_m = K_s$ , η αληθής σταθερά διάσπασης του **ES**, η  $K_m$ , μπορεί να θεωρηθεί για κάποιες αιτίες ως φαινόμενη σταθερά διάσπασης. Για παράδειγμα, η **[E]** στο διάλυμα μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση,

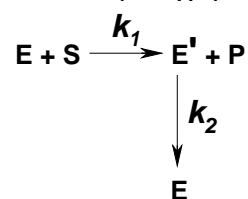
$$\frac{[E][S]}{\sum [ES]} = K_m \quad (1.2)$$

όπου  $\sum [ES]$  είναι άθροισμα όλων των προσδεμένων ενζυμικών ειδών<sup>1</sup>.

Η γενική ιδέα των **φαινόμενων τιμών** είναι πολύ χρήσιμη, ενώ εμφανίζεται και σε άλλα φαινόμενα, όπως στις τιμές  $pK_a$ . Πολύ συχνά μια τιμή  $pK_a$  δεν αναπαριστά τον μικροσκοπικό ιονισμό κάποιας συγκεκριμένης ομάδας αλλά είναι ένας συνδυασμός αυτής της τιμής καθώς και ποικίλων σταθερών ισορροπίας μεταξύ διαφόρων διαμορφωτικών καταστάσεων του μορίου. Το αποτέλεσμα είναι μια **φαινόμενη τιμή  $pK_a$** , την οποία μπορούμε να την χειριστούμε με τιλοδότηση ως μια απλή  $pK_a$ .

Αυτή η απλή στη σκέψη προσέγγιση δεν θα πρέπει να γίνεται αποδεκτή σε κάθε κατάσταση και όταν γίνεται αναφορά σε επιδράσεις θερμοκρασίας, pH, κ.λ.π. στην

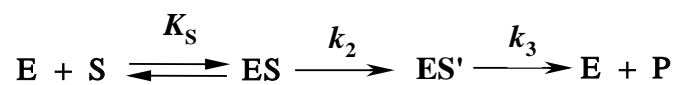
<sup>1</sup> Είναι δυνατό να υπάρχουν κινητικά περιέργες καταστάσεις, οι οποίες να ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten χωρίς το ένζυμο να είναι κορεσμένο με το υπόστρωμα. Για παράδειγμα στο παρακάτω σχήμα η δραστική μορφή του ενζύμου αντιδρά με το υπόστρωμα, με μία αντίδραση δευτέρας τάξης, προς προϊόντα και μια μη δραστική μορφή του ενζύμου, **E'**, η οποία μετατρέπεται αργά προς την δραστική μορφή. Φαινόμενη κινητική κορεσμού δίνει  $k_{cat}=k_2$  και  $K_m=k_2/k_1$ . Η εξίσωση (1.2) εφαρμόζεται στο παρόν παράδειγμα αν το **E'** το μεταχειριστούμε ως «προσδεμένη» μορφή του ενζύμου:



φαινόμενη  $K_m$ , θα πρέπει να γίνεται κατανοητό ότι τα συστατικά της σταθεράς ταχύτητας αυτού του όρου επίσης επηρεάζονται.

Τα ίδια εφαρμόζονται στις τιμές της  $k_{cat}$ . Η βιβλιογραφία περιέχει παραδείγματα, όπου εκτροπές της εξάρτησης της  $k_{cat}$  από την θερμοκρασία έχουν ερμηνευθεί ως ενδείξεις διαμορφωτικών αλλαγών στο ένζυμο όταν, πράγματι, υπάρχουν τέτοιες λόγω μιας διαφορετικής εξάρτησης από την θερμοκρασία των επιμέρους σταθερών ταχύτητας στην  $k_{cat}$ .

Μια απεικόνιση του ότι η  $K_m$  είναι μέτρο του ποσού του ενζύμου που είναι προσδεμένο σε οποιαδήποτε μορφή σε οποιοδήποτε υπόστρωμα δίνεται από τον ακόλουθο μηχανισμό (τριών σταδίων):



**Σχήμα 1.23:** Η  $K_m$  μπορεί να είναι ίση ή διαφορετική από την  $K_s$ .

Εφαρμογή της προσέγγισης της στάσιμης κατάστασης στο  $[ES']$  δίνει

$$[ES'] = [ES] \frac{k_2}{k_3} \quad (1.3)$$

Όταν  $k_3 \ll k_2$ , ισχύει  $[ES'] \gg [ES]$ , έτσι ώστε το  $ES'$  συμμετέχει πιο σημαντικά στην  $K_m$  από ότι το  $ES$  και είναι το κυρίαρχο είδος του προσδεμένου ενζύμου. Χωρίς λύση των εξισώσεων για την συγκεκριμένη αντίδραση, μπορούμε να πούμε διαισθητικά ότι η  $K_m$  θα πρέπει να είναι μικρότερη από την  $K_s$  κατά έναν παράγοντα περίπου  $k_2/k_3$ , δηλαδή

$$K_m \approx K_s \frac{k_3}{k_2} \quad (1.4)$$

Σε όλες τις περιπτώσεις, η  $K_m$ , θα πρέπει να θεωρείται ως ίση προς την συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία παρατηρείται η σχέση  $v = V_{max}/2$

- ✓ **κανόνας:** Η  $K_m$  είναι μια φαινόμενη σταθερά διάσπασης, η οποία θα πρέπει να επεξεργάζεται ως η συνολική σταθερά διάσπασης όλων των ενζυμικά προσδεμένων ειδών. <sup>171</sup>

### 1.5.3.γ Η έννοια της $k_{cat}$ . Η καταλυτική σταθερά

Στον απλό μηχανισμό Michaelis-Menten όπου υπάρχει μόνο το  $ES$  και όλα τα στάδια πρόσδεσης είναι ταχεία, η  $k_{cat}$ , είναι απλά η σταθερά ταχύτητας πρώτης

τάξης, για την χημική μετατροπή του **ES** προς **EP**. Σε πιο πολύπλοκες αντιδράσεις, η  $k_{cat}$ , είναι συνάρτηση όλων των σταθερών ταχύτητας πρώτης τάξης και δεν μπορεί να αποδοθεί σε κάποια επιμέρους πορεία εκτός και αν υπάρχουν άλλα απλοποιητικά στοιχεία. Στο παράδειγμα της αντίδρασης του Σχήματος 1.2 (ενότητα 1.1.2), η  $k_{cat}$  φαίνεται να είναι συνάρτηση των  $k_2$  και  $k_3$ . Αλλά αν μία από αυτές τις σταθερές ταχύτητας ( $k_2$  ή  $k_3$ ) είναι πολύ μικρότερη από την άλλη, τότε αυτή θα ισούται προς την  $k_{cat}$ . Ως προέκταση της τελευταίας πρότασης προκύπτει ότι η  $k_{cat}$  δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από οποιαδήποτε σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης κατά την προς τα προϊόντα πορεία.

- ✓ **κανόνας:** Η  $k_{cat}$  είναι μια πρώτης τάξης σταθερά ταχύτητας που αναφέρεται στις ιδιότητες και τις αντιδράσεις των συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος, ενζύμου ενδιάμεσου και ενζύμου-προϊόντος.<sup>171</sup>

#### 1.5.4 Εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ από την τιμή της (απόλυτης) θερμοκρασίας και την τιμή pH

##### 1.5.4.α Εξάρτηση από την (απόλυτη) θερμοκρασία των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ (εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius)

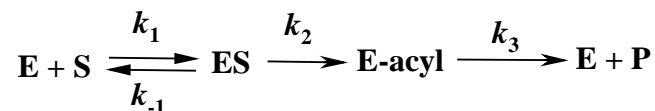
Η θερμοκρασία του διαλύματος στο οποίο επωάζεται και στη συνέχεια δρα το ένζυμο είναι σημαντικός παράγοντας και επηρεάζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Τα ένζυμα, γενικότερα, παρουσιάζουν μέγιστη δράση συνήθως σε θερμοκρασίες κοντά στην θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και σπανιότερα σε θερμοκρασίες πολύ μικρότερες ή πολύ μεγαλύτερες από αυτήν. Τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας πάνω σε ένα ένζυμο μπορεί να είναι αντιστρεπτά ή όχι, σε μια ευρεία περιοχή τιμών pH του μέσου της αντίδρασης. Ωστόσο, σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (<40°C) οι ενζυμικές αντιδράσεις επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο με οποιαδήποτε χημική αντίδραση. Η δημιουργία π.χ. του συμπλόκου **ES** και η διάσπασή του σε **E** και **P** επηρεάζονται από κινητικές σταθερές των οποίων η σχέση με τη θερμοκρασία ακολουθεί το νόμο του Arrhenius  $k = Ae^{-E/RT}$ . Όμως, σε πολλές περιπτώσεις όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία (>30°C), τόσο περισσότερο μετουσιώνεται το ένζυμο (άρα μειώνεται η  $[E]_0$ ) ενώ ανάλογη είναι και η επίδραση στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Ο ορθός τρόπος καταγραφής της δραστηριότητας ενός ενζύμου, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης συνίσταται στην καταγραφή των

πειραματικών δεδομένων, κρατώντας σταθερή την **[S]**, στις δύο διακριτές περιοχές, στη μία ισχύει **[S] << K<sub>m</sub>** (υπολογισμός της παραμέτρου **k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>**) ή **[S] >> K<sub>m</sub>** (υπολογισμός της παραμέτρου **k<sub>cat</sub>**). Στις περιπτώσεις των συστημάτων ενζύμου-υποστρώματος όπου δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η ενζυμική δραστικότητα στις δύο αυτές διακριτές περιοχές, τότε προσδιορίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος για κάθε μια θερμοκρασία και στη συνέχεια γίνεται απ' ευθείας προσαρμογή της εξίσωσης Michaelis-Menten στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι, καταγράφονται οι εξαρτήσεις των παραμέτρων **k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>** και **k<sub>cat</sub>** αντίστοιχα, ως προς την θερμοκρασία του μέσου της αντίδρασης.

Η τιμή της κινητικής παραμέτρου **k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>** από μόνη της δίνει λίγες πληροφορίες για τον μηχανισμό μιας ενζυμικής αντίδρασης. Είναι χρήσιμη κυρίως ως μέτρο της ενζυμικής δραστικότητας και της εξειδίκευσης των υποστρωμάτων που υφίστανται τη δράση του ενζύμου αφού αύξηση της τιμής της συνεπάγεται και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Εντούτοις, η εξάρτηση της από την απόλυτη θερμοκρασία και η μορφή της καμπύλης **k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> = f(T)** μπορεί, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, να δώσει πληροφορίες για το στάδιο το οποίο καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, την τιμή των σταθερών ταχύτητας και της ενέργειας ενεργοποίησης κάθε σταδίου της αντίδρασης. Όλα τα παραπάνω, αποτελούν σημαντικά δεδομένα για το μηχανισμό δράσης ενός ενζύμου και πολύ δύσκολα υπολογίζονται με κάποια άλλη μεθοδολογία. Η ενζυμική δραστικότητα, μέτρο της οποίας είναι και η κινητική παράμετρος **k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>**, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Το ένζυμο όμως, ως πρωτεΐνη, μετά από κάποια θερμοκρασία μετουσιώνεται και χάνει την δραστικότητά του. Έτσι, στις περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις, η μέγιστη δραστικότητα παρατηρείται σε θερμοκρασίες πολύ κοντά στην θερμοκρασία μετουσίωσης του ενζύμου. Μέχρι σήμερα, μόνο σε δύο περιπτώσεις έχει βρεθεί ένζυμο με μέγιστη δραστικότητα σε θερμοκρασία αρκετά μικρότερη από την θερμοκρασία μετουσίωσης του και ως παραδείγματα θα μπορούσαν να είναι η Θρομβίνη, η οποία είναι μια σερινοπρωτεϊνάση<sup>172</sup> και για μια κυστεϊνοπρωτεϊνάση η οποία απομονώθηκε από τον ιό της πολιομυελίτιδας<sup>173</sup> και είναι γνωστή με το κωδικό όνομα PV3C (Poliovirus Protease 3C). Τα ένζυμα αυτά επωάστηκαν σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από την θερμοκρασία στην οποία παρουσιάζουν την μέγιστη δραστικότητα και στη συνέχεια βρέθηκε ότι δεν χάνουν την δραστικότητά τους όταν επανέλθουν σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Αυτό αποτελεί απόδειξη ότι η μείωση της δραστικότητας σε

θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία της μέγιστης δραστηριότητας δεν οφείλονται σε μετουσίωση του ενζύμου. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η καμπύλη  $k_{cat}/K_m=f(T)$  μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης<sup>172,173</sup> και τότε ισχύουν τα παρακάτω, υπό την προϋπόθεση να ισχύει ο ελάχιστος μηχανισμός των τριών σταδίων (όμοια προς το σχήμα 1.2 και για λόγους καλύτερης διατύπωσης):



**Σχήμα1.24:** Ο ελάχιστος μηχανισμός δράσης, των τριών σταδίων, που ισχύει για τις πρωτεάσες

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K_S} \Leftrightarrow \frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} = k_1 \frac{\frac{k_2}{k_{-1}}}{1 + \frac{k_2}{k_{-1}}} = k_1 \frac{\alpha}{1 + \alpha} \quad (1.5)$$

όπου  $\alpha = \frac{k_2}{k_{-1}}$

Η μεταβολή μιας σταθεράς ταχύτητας  $k_j$  ως προς την απόλυτη θερμοκρασία  $T$ <sup>[124]</sup> δίδεται από την εξίσωση Arrhenius :

$$k_j = (k_j)_0 e^{\left[ -\frac{E_j}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (\text{εξίσωση Arrhenius})(1.6)$$

όπου  $k_j$  η σταθερά ταχύτητας σε θερμοκρασία  $T$ ,  $(k_j)_0$  η σταθερά της ταχύτητας στην θερμοκρασία αναφοράς  $T_0$ ,  $E_j$  η ενέργεια ενεργοποίησης για την αντίδραση στην οποία αναφέρεται η σταθερά ταχύτητας  $k_j$ ,  $R$  είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{K}$ ) (συνήθως  $T_0 = 298.15 \text{ }^{\circ}\text{K}$ ).

Με εφαρμογή της εξίσωσης **Arrhenius** για κάθε μία από τις σταθερές ταχύτητας στον τύπο της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  προκύπτει η εξίσωση (1.7)<sup>173</sup>, η οποία δίνει την εξάρτηση της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  από την θερμοκρασία  $T$ . Η ίδια σχέση χρησιμοποιείται υπό την μορφή της εξίσωσης (1.7α), ενώ για την παράμετρο  $k_{cat}$  ισχύει η εξίσωση (1.8):

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \left\{ \frac{\alpha_0 e^{\left[ -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{1 + \alpha_0 e^{\left[ -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \right\} (k_1)_0 e^{\left[ -\frac{E_1}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (1.7)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{(k_1)_0 (k_2)_0 e^{\left[ \frac{-(E_1+E_1)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{(k_{-1})_0 e^{\left[ \frac{-E_{-1}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} + (k_2)_0 e^{\left[ \frac{-E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \quad (1.7\alpha)$$

$$k_{cat} = \frac{(k_2)_0 (k_3)_0 e^{\left[ \frac{-(E_2+E_3)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{(k_2)_0 e^{\left[ \frac{-E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} + (k_3)_0 e^{\left[ \frac{-E_3}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \quad (1.8)$$

$$K_m = \frac{(k_{2,3})_0 e^{\left[ \frac{-(E_{2,3})}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \left[ 1 + \alpha_0 e^{\left[ \frac{E_\alpha}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \right]}{(k_1)_0 e^{\left[ \frac{-(E_1)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \alpha_0 e^{\left[ \frac{E_\alpha}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \left[ (k_2)_0 e^{\left[ \frac{-E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} + (k_3)_0 e^{\left[ \frac{-E_3}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \right]} \quad (1.9)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις,  $(k_1)_0$ ,  $(k_{-1})_0$ ,  $(k_2)_0$  και  $(k_3)_0$  είναι οι τιμές των αντίστοιχων σταθερών ταχύτητας στην θερμοκρασία αναφοράς  $T_0$ ,  $E_1$ ,  $E_{-1}$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ , είναι οι ενέργειες ενεργοποίησης των: (α) σταδίου σύνδεσης του ενζύμου με το υπόστρωμα, (β) της αντίστροφης αντίδρασης, (γ) της αντίδρασης διάσπασης του συμπλόκου **ES** προς ακυλ-ένζυμο και (δ) της αντίδρασης διάσπασης του ακυλ-ενζύμου προς ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα, αντίστοιχα, ενώ  $E_\alpha = E_{-1} - E_2$ ,  $T$  είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς  $K$ ,  $R$  είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) και  $\alpha_0$  είναι ο λόγος των σταθερών ταχύτητας  $k_2/k_{-1}$  στην θερμοκρασία αναφοράς  $T_0$  (συνήθως  $T_0 = 298.15 \text{ K}$ ). Εάν  $\alpha \gg 1$ , τότε  $k_2 \gg k_{-1}$ , και η παράμετρος  $k_{cat}/K_m = k_1$ . Σε αυτήν την περίπτωση, η μεταβολή της  $k_{cat}/K_m$  με την θερμοκρασία είναι ίδια με την μεταβολή της σταθεράς ταχύτητας  $k_1$  με την θερμοκρασία.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση (1.10), η οποία στηρίζεται στη σχέση μεταξύ της αλλαγής της ελεύθερης ενέργειας

ενεργοποίησης Gibbs και των αλλαγών στην *ενθαλπία ενεργοποίησης* και την *εντροπία ενεργοποίησης*, δηλαδή  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ .

$$T \times [\ln(k/T)] = T \times [\ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R] - \Delta H^\ddagger/R \quad (1.10)$$

Στην εξίσωση (1.10),  $k$  είναι μία οποιαδήποτε σταθερά ταχύτητας, η τιμή της οποίας εξαρτάται από την μεταβολή της απόλυτης θερμοκρασίας κατά την εξίσωση Arrhenius  $k = Ae^{-E_a/RT}$  (σε όρους της θεωρίας της μεταβατικής κατάστασης και κατά την σχέση  $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$ ), ενώ  $k_B$  είναι η σταθερά Boltzmann,  $h$  είναι η σταθερά Planck,  $R$  είναι η σταθερά των αερίων ( $8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), ενώ η τιμή της ποσότητας  $\ln(k_B/h)$  ισούται προς  $23.76$ <sup>174-175</sup>.

#### 1.5.4.β Εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ από την τιμή pH

Η τιμή pH του διαλύματος στο οποίο επωάζεται και στη συνέχεια δρα το ένζυμο είναι σημαντικός παράγοντας και επηρεάζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης με επιδράσεις που ασκούνται:

- ✓ Στις ιονιζόμενες ομάδες του ενζύμου, κυρίως του καταλυτικού κέντρου και της ενεργού περιοχής (επίδραση στην  $k_{cat}/K_m$ ),
- ✓ Στη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος (επίδραση στην  $K_m$ ),
- ✓ Στον ιονισμό του συμπλόκου **ES** (επίδραση στην  $k_{cat}$ ),
- ✓ Στη σταθερότητα των δομών του ενζυμικού μορίου (επίδραση στις  $V_{max}$  και  $K_m$  και  $k_{cat}$ ).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω επιδράσεων μπορεί να είναι αντιστρεπτά ή όχι, σε μια ευρεία περιοχή θερμοκρασιών του μέσου της αντίδρασης.

Ο ορθός τρόπος καταγραφής της δραστηριότητας ενός ενζύμου, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης συνίσταται στην καταγραφή των πειραματικών δεδομένων, κρατώντας σταθερή την **[S]**, στις δύο διακριτές περιοχές, στη μια όπου ισχύει η σχέση **[S] << K<sub>m</sub>** και στη δεύτερη όπου ισχύει η σχέση **[S] >> K<sub>m</sub>**. Στις περιπτώσεις των συστημάτων ενζύμου-υποστρώματος όπου δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η ενζυμική δραστηριότητα στις δύο αυτές διακριτές περιοχές, τότε προσδιορίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος για κάθε μια τιμή pH και στη συνέχεια γίνεται απ' ευθείας προσαρμογή της εξίσωσης Michaelis-Menten στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι, καταγράφονται οι εξαρτήσεις των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$



αντίστοιχα, ως προς την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης. Από την μορφή των καμπυλών  $k=f(\text{pH})$  εξάγονται σπουδαιότατα συμπεράσματα για τον μηχανισμό δράσης του υπό μελέτη ενζύμου.

Για την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, υπό την μορφή  $k_{\text{cat}}/K_m = f(\text{pH})$  ή  $k_{\text{cat}} = f(\text{pH})$ , έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα αντιδράσεων τα οποία οδηγούν στην δημιουργία μιας γενικής μορφής εξίσωσης [εξίσωση (1.11)].

$$(k)_{\text{obs}} = \sum_{i=1}^n \frac{(k)_{\text{XH}_{i-1}}^{\text{lim}}}{\left(1 + \sum_{j=1}^n B_{i,j}\right)} \quad (1.11)$$

Στην εξίσωση (1.11), οι  $(k)_{\text{obs}}$  και  $(k)^{\text{lim}}$  αναφέρονται στις τιμές των παραμέτρων  $k_{\text{cat}}/K_m$  ή  $k_{\text{cat}}$  είτε και  $K_m$ , που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα και στις οριακές τους τιμές (δηλαδή τις θεωρητικά μέγιστες τιμές τους για κάθε πρωτονιακή κατάσταση  $\text{XH}_{i-1}$ ), αντίστοιχα. Στην ίδια εξίσωση,  $n$  είναι ο αριθμός των δραστικών πρωτονιακών καταστάσεων και  $B_{ij}$  είναι μια παράσταση της μορφής  $K_{\text{XH}_p}[\text{H}^+]^m$ , όπου οι τιμές των  $m$  και  $p$  είναι στοιχεία των μητρών  $\mathbf{I}$  και  $\mathbf{II}$ , αντίστοιχα, για  $i$  και  $j$ <sup>177,178</sup>, όπου:

### Μήτρα I

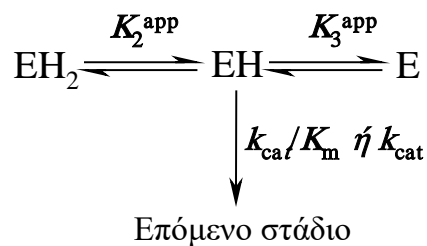
	j=1	2	3	4	5	6...n
i=1	1	2	3	4	5	6...n
2	-1	1	2	3	4	5...n-1
3	-2	-1	1	2	3	4...n-2
4	-3	-2	-1	1	2	3...n-3
5	-4	-3	-2	-1	1	2...n-4
6	-5	-4	-3	-2	-1	1...n-5
.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.
n	1-n	2-n	3-n	4-n	5-n	6-n...1

και

**Μήτρα II**

	j=1	2	3	4	5	...n
i=1	-1	-1.2	-1.2.3	-1.2.3.4	-1.2.3.4.5	...-1.2.3...n
2	1	-2	-2.3	-2.3.4	-2.3.4.5	...-2.3.4...n
3	1.2	2	-3	-3.4	-3.4.5	...-3.4.5...n
4	1.2.3	2.3	3	-4	-4.5	...-4.5.6...n
5	1.2.3.4	2.3.4	3.4	4	-5	...-5.6.7...n
6	1.2.3.4.5	2.3.4.5	3.4.5	4.5	5	...-6.7.8...n
.	.	.	.	.	.	.
n	1.2.3...n	2.3.4...n	3.4.5...n	4.5.6...n	5.6.7...n	...-n

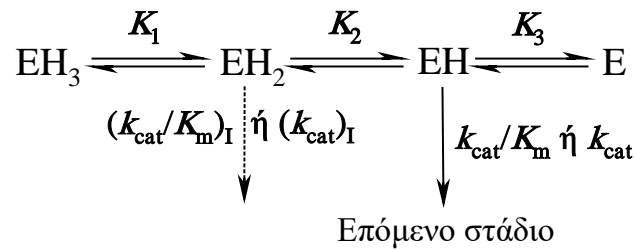
Τα **Σχήματα 1.25, 1.26 και 1.27** τα οποία παρουσιάζονται στην συνέχεια, αναπαριστούν πιθανά μοντέλα ιονισμού του ενζύμου και μάλιστα σε περιπτώσεις όπου οι καμπύλες αυτές έχουν, κυρίως, καμπανοειδή μορφή. Οι εξισώσεις που τα περιγράφουν είναι μερικές περιπτώσεις της γενικής εξίσωσης (1.11)



**Σχήμα 1.25:** Μοντέλο I, όπου το ένζυμο υπάρχει σε τρεις ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική.

Στο Μοντέλο I γίνεται η υπόθεση ότι δύο ενεργά κατάλοιπα του ενζύμου ιονίζονται ώστε να πραγματοποιηθεί το στάδιο, στο οποίο αναφέρεται η υπό μελέτη κινητική παράμετρος. Επίσης, υποθέτουμε ότι ο πιθανός ιονισμός του ενζύμου δίνει συνολικά τρεις πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μία είναι δραστική (**EH**). Η εξίσωση (1.12) περιγράφει το Μοντέλο I.

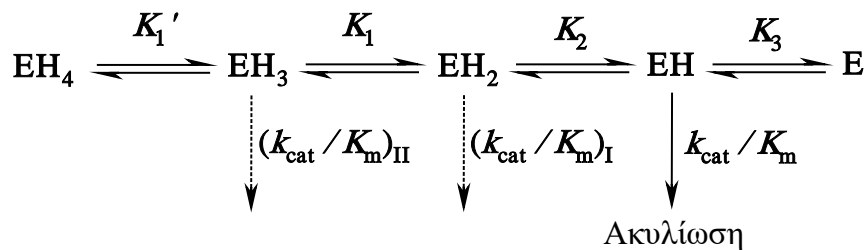
$$(k)_{\text{obs}} = \frac{(k)^{\text{lim}}}{1 + 10^{\text{p}K_2^{\text{app}} - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{p}K_3^{\text{app}}}} \quad (1.12)$$



**Σχήμα 1.26:** Μοντέλο II, όπου το ένζυμο υπάρχει σε τέσσερις ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική.

Στο Μοντέλο II γίνεται η υπόθεση, όπως αυτή διατυπώθηκε στο προηγούμενο μοντέλο, ότι τρία ενεργά κατάλοιπα του ενζύμου ιονίζονται ώστε να πραγματοποιηθεί το στάδιο, στο οποίο αναφέρεται η υπό μελέτη κινητική παράμετρος. Επίσης, υποθέτουμε ότι ο πιθανός ιονισμός του ενζύμου δίνει συνολικά τέσσερις πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μια είναι δραστική (EH). Η εξίσωση (1.13) περιγράφει το Μοντέλο II.

$$(k)_{\text{obs}} = \frac{(k)^{\text{lim}}}{1 + 10^{\text{p}K_1 + \text{p}K_2 - 2\text{pH}} + 10^{\text{p}K_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{p}K_3}} \quad (1.13)$$



**Σχήμα 1.27:** Μοντέλο III, όπου το ένζυμο υπάρχει σε πέντε ιονιζόμενες καταστάσεις, όπου μία μόνο είναι δραστική

Στο Μοντέλο III γίνεται η υπόθεση, με παρόμοια λογική όπως αυτή διατυπώθηκε στα δύο προηγούμενα μοντέλα, ότι τέσσερα ενεργά κατάλοιπα του ενζύμου ιονίζονται ώστε να πραγματοποιηθεί το στάδιο, στο οποίο αναφέρεται η υπό μελέτη παράμετρος. Επίσης, υποθέτουμε ότι ο πιθανός ιονισμός του ενζύμου δίνει συνολικά πέντε πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μια είναι δραστική (EH). Η εξίσωση (1.14) περιγράφει το Μοντέλο III.

$$(k)_{\text{obs}} = \frac{(k)^{\text{lim}}}{1 + 10^{\text{p}K_1' + \text{p}K_1 + \text{p}K_2 - 3\text{pH}} + 10^{\text{p}K_1 + \text{p}K_2 - 2\text{pH}} + 10^{\text{p}K_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{p}K_3}} \quad (1.14)$$

Μοντέλα στα οποία γίνεται η υπόθεση ότι το ένζυμο υπάρχει σε περισσότερες από πέντε πρωτονιακές καταστάσεις δεν έγινε δυνατό να προσαρμόσουν τα πειραματικά δεδομένα της εργασίας αυτής. Το ίδιο αποτέλεσμα (αδυναμία προσαρμογής πειραματικών δεδομένων) προέκυψε με μοντέλα στα οποία πρέπει να υποθεθεί ότι περισσότερες από μία πρωτονιακές καταστάσεις είναι δραστικές (καμπύλες που δεν έχουν σχήμα καμπάνας αλλά περισσότερο πολύπλοκο).

## 1.6 Μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων

### 1.6.1 Εισαγωγή

**Ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη (Ι.Φ.Δ.)** ονομάζεται το φαινόμενο που παράγεται από την εισαγωγή ενός ατόμου δευτερίου (D) στη θέση ενός πρωτονίου (H), ως αποτέλεσμα ανταλλαγής μεταξύ διαλυμένης ουσίας (π.χ. του μορίου ενός ενζύμου ή του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος) και διαλύτη. Το **Ι.Φ.Δ.** αναφέρεται σε μεταβολές είτε των σταθερών ταχύτητας είτε των σταθερών ισορροπίας μιας αντίδρασης (π.χ. ενζυμικής), σε μίγματα νερού (H<sub>2</sub>O) και δευτεριωμένου (D<sub>2</sub>O) νερού<sup>179</sup>.

Στην ενζυμική κινητική, γίνονται μια σειρά πειραμάτων σε υδατικά διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε H<sub>2</sub>O και D<sub>2</sub>O με αποτέλεσμα να παράγονται ισοτοπικά φαινόμενα που προέρχονται από την αλλαγή της σύστασης του διαλύτη. Αυτά τα πειράματα μπορούν να οδηγήσουν στον προσδιορισμό των πρωτονίων που μεταφέρονται μεταξύ διαφόρων ανταλλάξιμων θέσεων στο μόριο ενός ενζύμου και στο μόριο του υποστρώματός του και εμπλέκονται στο μηχανισμό κατάλυσης, κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής αντίδρασης (θεμελιώδεις είτε και μεταβατικές καταστάσεις). Η κεντρική ιδέα αυτής της διαδικασίας συνίσταται στην βαθμιαία μεταβολή του ατομικού κλάσματος του δευτερίου του διαλύτη, που έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των τιμών των σταθερών της αντίδρασης, είτε αυτές είναι σταθερές ταχύτητας είτε σταθερές ισορροπίας. Αυτή ακριβώς η τεχνική καλείται **τεχνική καταμέτρησης πρωτονίων (proton inventory)**<sup>179</sup>.

Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται οι σταθερές της ενζυμικής αντίδρασης (σταθερές ταχύτητας ή σταθερές ισορροπίας) σε μια σειρά από ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη νερό διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (δηλαδή διαφορετικού

ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n = \frac{[D_2O]}{[H_2O] + [D_2O]}$ ). Αυτή η σειρά αρχίζει με διαλύτη

H<sub>2</sub>O και συνεχίζεται δια μέσου μιγμάτων διαφορετικής περιεκτικότητας σε H<sub>2</sub>O και D<sub>2</sub>O, με συνεχώς αυξανόμενο ατομικό κλάσμα δευτερίου  $n$  και τελειώνει με σχεδόν καθαρό D<sub>2</sub>O. Έτσι, προσδιορίζεται η μεταβολή μιας σταθεράς συναρτήσεως του ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$  του διαλύτη<sup>180</sup>.

Τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν είναι της μορφής  $(n, k_n)$  για μια σταθερά ταχύτητας ή  $(n, K_n)$  για μια σταθερά ισορροπίας και προσδιορίζουν την μορφή της καμπύλης αυτών των σταθερών ως συναρτήσεων του  $n$  [ $k_n = f(n)$  ή  $K_n = f(n)$ , αντίστοιχα]. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι παραπάνω μορφές αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την διερεύνηση του μηχανισμού μιας ενζυμικής αντίδρασης<sup>181</sup>. Π.χ. η μορφή της καμπύλης της συνάρτησης  $(k_{cat})_n = f(n)$  μπορεί να μας δώσει τον αριθμό των πρωτονίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της κατάλυσης<sup>182</sup>. Εάν είναι ευθεία τότε ένα μόνο πρωτόνιο συμμετέχει στο μηχανισμό της κατάλυσης, εάν είναι καμπύλη δευτεροβάθμιας συνάρτησης τότε συμμετέχουν δύο πρωτόνια και τέλος εάν είναι καμπύλη εκθετικής συνάρτησης τότε συμμετέχουν περισσότερα από δύο. Για να προσδιοριστεί η συνεισφορά κάθε πρωτονιακής θέσης στη διαμόρφωση του ισοτοπικού φαινομένου, θα πρέπει να γίνει προσαρμογή της κατάλληλης εξίσωσης  $k_n = f(n)$  ή  $K_n = f(n)$ , στα πειραματικά δεδομένα, όπως θα δούμε στη συνέχεια.

Τέτοιες εξισώσεις, που περιγράφουν την μεταβολή μιας κινητικής σταθεράς συναρτήσεως του ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$ , είναι οι απλοποιημένες μορφές της γενικής εξίσωσης **Gross-Butler-Kresge** [εξίσωση (1.15)]<sup>179</sup>.

$$k_n = k_0 \frac{\prod_i^v (1 - n + n \phi_i^T)}{\prod_j^\mu (1 - n + n \phi_j^G)} \quad (1.15)$$

όπου  $k_n$  και  $k_0$  (ή  $K_n$  και  $K_0$ ) είναι οι υπό μελέτη ενζυμικές κινητικές σταθερές ταχύτητας (ή σταθερές ισορροπίας) σε διαλύτη μίγματος D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$  και σε H<sub>2</sub>O, αντίστοιχα, ενώ  $v$  και  $\mu$  αναφέρονται στον αριθμό των πρωτονίων που ανταλλάσσονται κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης στη μεταβατική (**T**) (ή στην τελική κατάσταση) και στην θεμελιώδη κατάσταση (**G**), αντίστοιχα και συμμετέχουν στον μηχανισμό. Τέλος  $\phi_i^T$  και  $\phi_j^G$  είναι οι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης<sup>179,180</sup> του  $i^{\text{ου}}$  πρωτονίου που ανταλλάσσεται στην μεταβατική (**T**) (ή στην τελική κατάσταση) και του  $j^{\text{ου}}$  πρωτονίου που ανταλλάσσεται στην αρχική κατάσταση (**G**), αντίστοιχα και συμμετέχουν στον μηχανισμό.

Η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων, για να μπορέσει να συμβάλλει στην ανάλυση του μηχανισμού μιας ενζυμικής αντίδρασης, βασίζεται σε συμπεράσματα που προκύπτουν τόσο από το σχήμα της καμπύλης των διαφόρων συναρτήσεων  $k_n = f(n)$  ή  $K_n = f(n)$ , όσο και από το είδος της βέλτιστης εξίσωσης που προσαρμόζει τα πειραματικά δεδομένα (δηλ. ευθεία γραμμή, δευτέρου ή ανωτέρου βαθμού εξίσωση, μια απλοποιημένη μορφή της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge κ.λ.π.). Το μέγεθος του συνολικού ισοτοπικού φαινομένου, δηλαδή ο λόγος  $\frac{k_n}{k_0}$ , έχει επίσης σημαντική βαρύτητα. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων, για να μπορέσει να προσδιορίσει τον μηχανισμό της αντίδρασης, λαμβάνει υπ' όψιν και άλλες πληροφορίες για το συγκεκριμένο σύστημα ενζύμου-υποστρώματος, οι οποίες προέρχονται και από την εφαρμογή άλλων μεθοδολογιών. Αποτελεί όμως ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια ενός ερευνητή ενζυμολόγου αφού σε πολλές περιπτώσεις δίνει πληροφορίες για τον μηχανισμό μιας ενζυμικής αντίδρασης που πολύ δύσκολα θα έδιναν άλλες μεθοδολογίες.

### 1.6.2 Μίγματα $D_2O/H_2O$

Με τον όρο ανταλλάξιμες υδρογονικές θέσεις στο μόριο μιας ουσίας αναφερόμαστε σε θέσεις υδρογόνου στις οποίες μπορεί να γίνει ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο. Όταν μια ουσία, η οποία διαθέτει ανταλλάξιμες υδρογονικές θέσεις, βρεθεί σε μίγμα  $D_2O/H_2O$  τότε μπορεί να αλλάξουν οι τιμές των κινητικών παραμέτρων μιας αντίδρασης στην οποία συμμετέχει ανάλογα με το αν στην υδρογονική θέση υπάρχει πρωτόνιο ή δευτέριο. Είναι δυνατόν να κατασκευάσουμε απλές μαθηματικές εκφράσεις που συσχετίζουν τις διάφορες κινητικές σταθερές μιας ενζυμικής αντίδρασης σε μίγματα  $D_2O/H_2O$  με ισοτοπικούς παράγοντες κλασμάτωσης. Η κατασκευή των εκφράσεων αυτών γίνεται με τη βοήθεια κατάλληλων υποθέσεων και με τη χρήση διαφόρων ενζυμικών κινητικών μετρήσεων<sup>180</sup>.

Εάν το  $H_2O$ , ως διαλύτης, αντικατασταθεί από  $D_2O$ , τότε οι σταθερές ταχύτητας και ισορροπίας μιας αντίδρασης που λαμβάνει χώρα στο διάλυμα μπορεί ν' αλλάξουν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό αποτελεί το ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη **(Ι.Φ.Δ.)** και οφείλεται σ' ένα ή σε περισσότερα από τα εξής:

**(α).** Το νερό, εκτός από διαλύτης, είναι και αντιδρών συστατικό.

(β). Τα πρωτόνια των διαλυμένων ουσιών, τα οποία συμμετέχουν στην αντίδραση, μπορεί να αντικαταστάθηκαν από άτομα δευτερίου.

(γ). Μπορεί να επηρεάστηκε η φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαλυμένων ουσιών και διαλύτη.

Κάνοντας κινητικές μελέτες του **I.Φ.Δ.** σε μια σειρά μιγμάτων  $D_2O/H_2O$  για μια σειρά από διαλυμένες ουσίες με διάφορες υδρογονικές θέσεις μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα κατάλογο με υδρογονικές θέσεις που συνεισφέρουν στο **I.Φ.Δ.** και το μέγεθος της συνεισφοράς για την κάθε μία. Είναι περισσότερο επιθυμητό, κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης, να ταυτοποιήσουμε τα ισοτοπικά φαινόμενα για κάθε μια από τις υδρογονικές θέσεις παρά για όλες τις θέσεις μαζί.

### 1.6.3 Ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης

Ορίζουμε ως **εσωτερικές φ-θέσεις** τις υδρογονικές θέσεις πάνω στο δομικό σκελετό της διαλυμένης ουσίας στις οποίες γίνεται ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο. Ακόμη ορίζουμε ως **εξωτερικές φ-θέσεις** τις υδρογονικές θέσεις πάνω στα μόρια του (πολυμερούς) νερού οι οποίες αλληλεπιδρούν ισχυρά με την διαλυμένη ουσία. Η διάκριση μεταξύ εσωτερικών φ-θέσεων και εξωτερικών φ-θέσεων σχετίζεται με τον μηχανισμό της αντίδρασης και καθίσταται εμφανής μόνο με χρήση δεδομένων που προέρχονται από **I.Φ.Δ.**

Όταν μια ουσία **X**, η οποία διαθέτει μια θέση για ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο, βρεθεί μέσα σε μίγμα  $D_2O/H_2O$  με ατομικό κλάσμα δευτερίου **n** (το ατομικό κλάσμα πρωτονίου είναι **1-n**) δημιουργείται η εξής ισορροπία:



όπου  $L = \{H, D\}$ . Ως ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης **φ** της συγκεκριμένης υδρογονικής θέσης ορίζεται η σταθερά της παραπάνω ισορροπίας,

$$\text{δηλαδή} \quad \varphi = \frac{[XD][HOL]}{[XH][DOL]} \quad (1.16)$$

Επομένως, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι:

$$\varphi = \frac{\frac{[XXD]}{[XH]}}{\frac{[DOL]}{[HOL]}} \Rightarrow \varphi = \frac{[XXD]}{[XH]} \Rightarrow \frac{[XD]}{[XH]} = \varphi \frac{n}{1-n}$$

$$\text{Ακόμη } [XL] = [XH] + [XD] = [XH] \left( 1 + \frac{[XD]}{[XH]} \right) = [XH] \left( 1 + \varphi \frac{n}{1-n} \right) = [XH] \frac{(1-n+n\varphi)}{1-n} \Rightarrow$$

$$[XH] = \frac{[XL](1-n)}{1-n+n\varphi} \quad \text{ή} \quad [XD] = \frac{[XL]n\varphi}{1-n+n\varphi}.$$

Εάν η ουσία διαθέτει περισσότερες από μία υδρογονικές θέσεις για ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο, οπότε θα είναι της μορφής  $XL_1, L_2, \dots, L_v$ , τότε με ανάλογο τρόπο προκύπτουν οι σχέσεις:

$$\frac{[XH_1H_2\dots H_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{(1-n)^v}{\prod_i (1-n+n\varphi)_i}, \quad \frac{[XH_1\dots D_i\dots H_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{(1-n)^{v-1}\varphi_i}{\prod_i (1-n+n\varphi_i)} \quad \text{κ.ο.κ. και τέλος}$$

$$\frac{[XD_1D_2\dots D_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{n^v}{\prod_i (1-n+n\varphi_i)}.$$

Από τις παραπάνω σχέσεις με την βοήθεια του

ορισμού της σταθεράς ταχύτητας ή της σταθεράς ισορροπίας, προκύπτει η γενική μορφή της εξίσωσης **Gross-Butler-Kresge** [εξίσωση (1.15)]<sup>179,180</sup>.

$$k_n = k_0 \frac{\prod_i (1-n+n\varphi_i^T)}{\prod_j (1-n+n\varphi_j^G)} \quad (1.15)$$

Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είναι δυνατό να δημιουργηθούν πίνακες οι οποίοι δίνουν την τιμή του ισοτοπικού παράγοντα κλασμάτωσης για διαφόρων τύπων υδρογονικές θέσεις, καθώς και την τιμή του **I.Φ.Δ.** που παράγεται όταν αντικατασταθεί το πρωτόνιο κάθε υδρογονικής θέσης με δευτέριο.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## **2Α. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΧΟΙΡΟΥ (PPE)**

### **2Α.1 Υλικά**

#### **2Α.1.1 Ένζυμα**

Το ενζυμικό παρασκεύασμα της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αγοράστηκε από την εταιρεία SIGMA (Elastase from porcine pancreas, Type I,  $\geq 4.0$  units/mg protein, E1250).

#### **2Α.1.2 Χημικά αντιδραστήρια και λοιπά**

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες, τα διάφορα άλατα, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς σερινοπρωτεϊνών 3,4-δichλωροϊσοκουμαρίνη και φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλ-φθορίδιο (PMSF) και το βαρύ νερό ( $D_2O$ ) αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA. Το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA αγοράστηκε από την εταιρεία BACHEM. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς  $CF_3C(O)-DA-NHPh-p-CF_3$ ,  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ ,  $CF_3C(O)-VA-NHPh-p-CF_3$  και  $CF_3C(O)-LA-NHPh-p-CF_3$  συντέθηκαν στο Εργαστήριο και ήταν μια ευγενική προσφορά του Ομότιμου Καθηγητή Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ.

#### **2Α.1.3 Υπολογιστικά Προγράμματα**

Χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πακέτο Schrödinger Software suite, ver. 2014- 4 LLC (New York, NY) για την πραγματοποίηση προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής. Για την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και την γραφική παράσταση αυτών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Microcal Origin 8.0.

## **2Α.2 Καμπύλη Michaelis-Menten της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου σε $\theta = 25^\circ C$ και τιμή $pH = 8.00$**

Για τον υπολογισμό των παραμέτρων Michaelis-Menten της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PPE) πραγματοποιήθηκαν κινητικές μετρήσεις με την μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος  $[S] = \{71 - 4200 \mu M\}$ , σε τιμή  $pH = 8.00$  και σε

θερμοκρασία 25°C του μέσου αντίδρασης και βασίστηκαν στην μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου ( $\Delta\text{Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$ ), κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA. Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ( $[\text{S}]_i$ ,  $v_i$ )

προσαρμόστηκαν με την εξίσωση Michaelis-Menten  $v = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}]_0[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$  (εξ

ορισμού  $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{E}]_0$ ), υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{\text{cat}}/K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$  και  $K_m$ , ενώ η προσαρμογή τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος **Origin**<sup>178</sup>. Σε όλες τις προσαρμογές, ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη.

### 2A.3 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_m$ , $k_{\text{cat}}$ και $1/K_m$ της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $pK_a$

Μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{\text{cat}}/K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$  και  $1/K_m$  ως συνάρτηση της τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA.

Ο προσδιορισμός των παραμέτρων σε διαφορετικές τιμές pH του ρυθμιστικού διαλύματος, στο οποίο γίνεται η αντίδραση, πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 25 UV-VIS, διπλής δέσμης, εφοδιασμένο με σύστημα θερμοστατούμενων κυψελίδων και πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής. Οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Η π-νιτροανιλίνη παρουσιάζει ένα μοριακό συντελεστή απόσβεσης  $\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  και σε μια ευρεία περιοχή τιμών pH, από 2.5 ως 12.0<sup>3</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα για τις διάφορες τιμές pH. Συγκεκριμένα, για τιμές pH από 5.50 έως 7.50 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών, από 8.00 έως 9.50 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M

Tris-HCl και τέλος από 10.00 έως 10.50 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M ανθρακικών.

♦ Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών:

Διάλυμα A: 0.1 M δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (13.61 g σε 1000 ml).

Διάλυμα B: 0.1 M όξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (17.81g σε 1000 ml).

♦ Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl:

Διάλυμα A: 0.1M Tris base (12.11 g σε 1000 ml)

Διάλυμα B: 0.5 M HCl.

♦ Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M ανθρακικών:

Διάλυμα A: 0.2 M άνυδρο ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (10.6 g σε 1000 ml)

Διάλυμα B: 0.2 M όξινο ανθρακικό νάτριο ( $\text{NaHCO}_3$ ) (8.4 g σε 1000 ml)

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30$  nM και υπόστρωμα Suc-AAA-pNA, σε συγκεντρώσεις (i) ( $[S] = 120$   $\mu\text{M}$ )  $\ll K_m$  και (ii) ( $[S] = 4300$   $\mu\text{M}$ )  $\gg K_m$  σε διαλύματα DMSO και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 940  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος, 40  $\mu\text{l}$  DMSO, 10  $\mu\text{l}$  ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10  $\mu\text{l}$  διαλύματος υποστρώματος Suc-AAA-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π-νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου ( $\Delta\text{Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$ ) για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης. Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης  $> 0.999$ . Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ( $[S]_i$ ,  $v_i$ ) προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $1/K_m$ . Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος Origin<sup>178</sup>. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη.

## 2A.4 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της PPE ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης

Μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$ , σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την παγκρεατική ελαστάση χοίρου (PPE). Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων σε μια σειρά θερμοκρασιών που κυμαίνονταν από 20°C έως 60°C, αυξάνονταν κατά 5°C και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερωμένης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιονικής ισχύος 0.1 M, τιμής pH = 8.00 και μετρήθηκε η  $\Delta Abs_{410 \text{ nm}}/min$ , για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30 \text{ nM}$  και υπόστρωμα Suc-AAA-pNA, σε συγκεντρώσεις (i) ( $[S] = 120 \mu\text{M}$ )  $\ll K_m$  και (ii) ( $[S] = 4300 \mu\text{M}$ )  $\gg K_m$  σε διαλύματα DMSO. Η διαδικασία των κινητικών μετρήσεων ήταν η ίδια όπως αυτή που έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω, στην Ενότητα 2A.3, με τη διαφορά ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά διαφορετικών θερμοκρασιών. Η μείωση της δραστηριότητας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία της μέγιστης δραστηριότητας δεν οφείλεται σε μετουσίωση του ενζύμου, όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενα πειράματα θερμικής σταθερότητας του ενζύμου<sup>183,184</sup>.

Ακολουθως, όλες οι σταθερές ταχύτητας, καθώς και οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι ενεργοποίησης  $\Delta S^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta G^\ddagger$  υπολογίστηκαν με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μορφές της γενικής εξίσωσης Arrhenius (εξισώσεις 1.7α - 1.9), καθώς και σε μία μορφή της εξίσωσης Eyring (εξίσωση 1.10), αντίστοιχα και σχεδιάστηκε το ενεργειακό διάγραμμα της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA<sup>185,186</sup>.

## 2A.5 Πειραματική πορεία της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων

### 2A.5.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με την μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων, μια τυπική πειραματική πορεία περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών (σταθερές ταχύτητας ή σταθερές ισορροπίας) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε διάφορα μίγματα  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο. Αν στην αντίδραση, στην οποία αναφέρεται η κινητική σταθερά, εμφανίζεται ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη (**I.Φ.Δ.**), τότε είναι δυνατό αναλύοντας τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα για την ταχύτητα και την ισορροπία της αντίδρασης να προσδιορίσουμε τον αριθμό των πρωτονίων που συμμετέχουν στον μηχανισμό της αντίδρασης, ανταλλάσσονται με τον διαλύτη και συνεισφέρουν στο ολικό I.Φ.Δ., καθώς και στην τιμή των αντίστοιχων ισοτοπικών παραγόντων κλασμάτωσης  $\phi^{181}$ .

Αρχικά, προσδιορίζουμε τις κινητικές σταθερές της ενζυμικής αντίδρασης που μας ενδιαφέρουν σε μια σειρά μιγμάτων  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  διαφορετικού ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$ . Στη συνέχεια, προσαρμόζουμε την εξίσωση **Gross-Butler-Kresge (GBK)** στα πειραματικά δεδομένα  $(n, k_n)$  ή  $(n, \frac{k_n}{k_0})$  και

επιλέγουμε εκείνη την μορφή που προσαρμόζεται καλύτερα. Η γενική μορφή της εξίσωσης **GBK** είναι μια συναρτησιακή σχέση της μορφής  $k_n = f(n)$  [ή  $K_n = f(n)$ ] ή  $\frac{k_n}{k_0} = f(n)$  [ή  $\frac{K_n}{K_0} = f(n)$ ]. Είναι όμως αρκετά πολύπλοκη και πρακτικά

δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη γενική μορφή της. Γι' αυτό αναγκαζόμαστε να χρησιμοποιούμε απλοποιημένες μορφές της, που βασίζονται σε τέτοια υποδείγματα ώστε να συμφωνούν και με άλλες κινητικές πληροφορίες. Επίσης, έχει αποδειχθεί<sup>179</sup> ότι η εξίσωση GBK ισχύει ακόμα και όταν αντί μιας σταθεράς ταχύτητας ( $k_n$ ) χρησιμοποιηθεί μια σταθερά ισορροπίας ( $K_n$ ). Στην περίπτωση αυτή, η εξίσωση GBK λαμβάνει την μορφή της εξίσωσης (2.1) όπου  $\nu$  και  $\mu$  είναι οι αριθμοί των πρωτονίων που συνεισφέρουν στο ολικό I.Φ.Δ., στην τελική κατάσταση (P) των προϊόντων και στην αρχική κατάσταση (G) των αντιδρώντων, αντίστοιχα. Στην ίδια εξίσωση ο αριθμός  $n$  είναι το ατομικό κλάσμα του δευτερίου στο μίγμα του διαλύτη,  $K_n$

και  $K_0$  είναι οι κινητικές σταθερές ισορροπίας της αντίδρασης σε μίγμα διαλυτών  $H_2O/D_2O$  με ατομικό κλάσμα δευτερίου  $n$  και μηδέν αντίστοιχα. Οι  $\phi_i^P$  και  $\phi_j^G$  είναι οι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης του  $i^{\text{ου}}$  ή του  $j^{\text{ου}}$  πρωτονίου των προϊόντων και των αντιδρώντων, αντίστοιχα.

$$k_n = k_0 \frac{\prod_i^{\nu} (1 - n + n \phi_i^T)}{\prod_j^{\mu} (1 - n + n \phi_j^G)} \quad (2.1)$$

Τα ένζυμα επειδή είναι πρωτεϊνικά μόρια, έχουν στον δομικό σκελετό τους πολλά πρωτόνια που ανταλλάσσονται με τον διαλύτη. Λίγα από αυτά όμως συνεισφέρουν στο Ι.Φ.Δ. και συνήθως ελάχιστα είναι τα πρωτόνια που συμβάλλουν καθοριστικά στη διαμόρφωση του Ι.Φ.Δ. Εάν ένα πρωτόνιο του δομικού σκελετού του ενζύμου ή του υποστρώματος δεν συμμετέχει στον μηχανισμό (ούτε άμεσα ούτε έμμεσα) τότε είναι δυνατόν να παράγει το λεγόμενο δευτερογενές Ι.Φ.Δ. Επειδή το δευτερογενές Ι.Φ.Δ. είναι πολύ μικρό σε σχέση με το αντίστοιχο πρωτογενές, το οποίο παράγεται από τα πρωτόνια τα οποία μετέχουν στον μηχανισμό (άμεσα ή έμμεσα), δεν το λαμβάνουμε καθόλου υπόψη εκτός και αν, σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις, δεν υπάρχει πρωτογενές Ι.Φ.Δ.

Παρ' όλα αυτά, ακόμη και όταν τα πρωτόνια που ουσιαστικά συμβάλλουν στην διαμόρφωση του Ι.Φ.Δ. είναι λίγα, χωρίς ένα κατάλληλο μοντέλο είναι δύσκολο να προβλέψουμε την ισοτοπική συνεισφορά καθενός πρωτονίου ξεχωριστά στην αρχική (G), στην μεταβατική (T) ή στην τελική (P) κατάσταση του αντιδρώντος συστήματος. Επίσης, δεν μπορούμε να κάνουμε προσαρμογή της γενικής εξίσωσης Gross-Butler-Kresge στα πειραματικά δεδομένα, αφού αυτή παραμένει ακόμη πολύπλοκη.

Έτσι αναγκαζόμαστε να κάνουμε διάφορες υποθέσεις οι οποίες βασίζονται σε ήδη υπάρχοντα δεδομένα που αφορούν την συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση (και προέρχονται, ίσως, από άλλου είδους μεθοδολογίες), ώστε η γενική εξίσωση GBK να μετασχηματιστεί σε μια περισσότερο απλοποιημένη μορφή κι έτσι να είναι δυνατή η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων. Κάθε τέτοια μορφή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο αριθμό μεταφερόμενων πρωτονίων από την αρχική στην μεταβατική ή τελική κατάσταση. Επιπλέον οι λιγότερες σε αριθμό παράμετροι της απλοποιημένης

εξίσωσης GBK προσδιορίζονται με μεγαλύτερη στατιστική ακρίβεια, όπως φαίνεται και από τα παρακάτω υποδείγματα:

**Υπόδειγμα 1:** Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική κατάσταση ισορροπίας (**G**) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**):

$$k_n = k_0 \frac{(1-n+n\varphi^T)}{(1-n+n\varphi^G)} \quad (2.2\alpha), \quad k_n = k_0 \frac{(1-n+n\varphi^T)^a}{(1-n+n\varphi^G)} \quad (2.2\beta)$$

**Υπόδειγμα 2:** Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική (**G**) και ένα κατά την τελική κατάσταση (**P**):

$$K_n = K_0 \frac{(1-n+n\varphi^P)}{(1-n+n\varphi^G)} \quad (2.3)$$

**Υπόδειγμα 3:** Μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**), όπου  $\varphi_1^G \approx 1$  και  $\varphi_2^G \approx 1$ :

$$k_n = k_0(1-n+n\varphi_1^T)(1-n+n\varphi_2^T) \quad (2.4)$$

**Υπόδειγμα 4:** Μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική (**G**) και δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**):

$$k_n = k_0 \frac{(1-n+n\varphi_1^T)(1-n+n\varphi_2^T)}{(1-n+n\varphi_1^G)(1-n+n\varphi_2^G)} \quad (2.5)$$

**Υπόδειγμα 5:** Μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική (**G**) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**):

$$k_n = k_0 \frac{(1-n+n\varphi^T)}{(1-n+n\varphi_1^G)(1-n+n\varphi_2^G)} \quad (2.6)$$

**Υπόδειγμα 6:** Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την αρχική (**G**) και δύο κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**):

$$k_n = k_0 \frac{(1-n+n\varphi_1^T)(1-n+n\varphi_2^T)}{(1-n+n\varphi^G)} \quad (2.7)$$

**Υπόδειγμα 7:** Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**), όπου  $\varphi^G \approx 1$ :

$$k_n = k_0(1-n+n\varphi^T)^p \quad \text{και} \quad K_n = K_0(1-n+n\varphi^P) \quad (2.8) \text{ και } (2.8\alpha)$$

**Υπόδειγμα 8:** Μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την αρχική (**G**) και δύο κατά την μεταβατική κατάσταση (**T**):



$$k_n = k_0 \frac{(1-n+n\phi^T)^2}{(1-n+n\phi^G)^2} \quad (2.9)$$

**Υπόδειγμα 9:** Όταν κατά την διάρκεια μίας κατ' επίφαση ή ιδεατής μεταβατικής κατάστασης μεταφέρονται  $\nu$  πρωτόνια, ενώ για την πραγματοποίησή της συνεισφέρουν δύο επιμέρους στάδια, ένα φυσικό ( $C_{Ph}$ ) και ένα χημικό ( $C_{Ch}$ ), τότε η πιο κατάλληλη απλοποιημένη μορφή της εξίσωσης **GBK** είναι η εξίσωση (2.10).

$$k_0 = \frac{k_n Z_1^n}{C_{Ph} + \frac{C_{Ch}}{(1-n+n\phi^T)^\nu}} \quad (2.10)$$

Στην εξίσωση (2.10):

$Z_1$  είναι ένας σύνθετος παράγοντας κλασμάτωσης που εκφράζει μία γενική αναδιοργάνωση διαλύτη, η οποία πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια είτε της πρόσδεσης του υποστρώματος, είτε και της απακυλίωσης του ενζύμου,

$\phi^T$  είναι παράγοντας κλασμάτωσης της μεταβατικής κατάστασης που αντιστοιχεί στο χημικό ( $C_{Ch}$ ) και αναφέρεται σε δύο ανταλλάξιμες περιοχές του συστήματος μεταφοράς φορτίου,

$C_{Ph}$  και  $C_{Ch}$  είναι δύο συντελεστές της μεταβατικής κατάστασης που αντιστοιχούν στο φυσικό και στο χημικό στάδιο, αντίστοιχα,

$\nu$  είναι ο αριθμός των πρωτονιακών περιοχών του συστήματος μεταφοράς φορτίου που συνεισφέρουν στο ολικό ισοτοπικό φαινόμενο.

Με προσαρμογή των εξισώσεων (2.2) ως (2.10) στα πειραματικά δεδομένα και με γνώμονα τις τιμές των παραμέτρων τους, τις τυπικές τους αποκλίσεις και τα λοιπά στοιχεία της στατιστικής ανάλυσης γίνεται δυνατή η επιλογή της βέλτιστης εξίσωσης-υποδείγματος. Οι παραπάνω απλοποιημένες μορφές (υποδείγματα) της εξίσωσης **GBK** μπορούν γενικά να παρασταθούν

με την εξίσωση  $\psi_n = \psi_0 \left[ \prod_i^k (1-n+n\phi_i) \right]$ , όπου  $k$  είναι ο αριθμός των

πρωτονίων που συνεισφέρουν στο Ι.Φ.Δ. και  $i = \{1,2,3, \dots, k\}$ . Εάν το Ι.Φ.Δ. παράγεται μόνο από ανταλλαγές πρωτονίων στην μεταβατική ή στην τελική

κατάσταση ( $\varphi_j^G = 1$ ) τότε θα είναι  $\psi_n = k_n$  (ή  $\psi_n = K_n$ ) και  $\psi_0 = k_0$  (ή  $\psi_0 = K_0$ ), αντίστοιχα. Ενώ αν το Ι.Φ.Δ. παράγεται μόνο από ανταλλαγές πρωτονίων στην αρχική κατάσταση ( $\varphi_i^T = 1$  ή  $\varphi_i^P = 1$ ) τότε θα είναι  $\psi_n = (k_n)^{-1}$  ή  $(K_n)^{-1}$  και  $\psi_0 = (k_0)^{-1}$  ή  $(K_0)^{-1}$ , αντίστοιχα. Κάνοντας πράξεις στην αμέσως προηγούμενη εξίσωση, παίρνουμε μια σχέση του γενικού τύπου  $\psi_n = \psi_0 + c_1n + c_2n^2 + \dots + c_k n^k$ , δηλαδή ένα πολυώνυμο με ανεξάρτητη μεταβλητή το  $n$  και βαθμού  $k$ . Τότε, οι τιμές των ισοτοπικών παραγόντων κλασμάτωσης  $\varphi_i$  μπορούν να προσδιορισθούν κατευθείαν από τους συντελεστές  $c_i$ . Ωστόσο, αυτό είναι μια επίπονη εργασία και δίνει εξωπραγματικές τιμές για τους  $\varphi_i$  όταν ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας του πειράματος (διαφορά του αριθμού των πειραματικών σημείων από τον αριθμό των παραμέτρων της εξίσωσης) είναι μικρός.

Αν, όμως, τα  $k$  πρωτόνια συνεισφέρουν το ίδιο στη διαμόρφωση του Ι.Φ.Δ., τότε η παραπάνω εξίσωση μπορεί να πάρει την μορφή  $\psi_n = \psi_0(1 - n +$

$$n\varphi)^k \Rightarrow \left[ \frac{\psi_n}{\psi_0} \right]^{\frac{1}{k}} - 1 = n(\varphi - 1). \text{ Η γραφική της παράσταση της τελευταίας}$$

εξίσωσης ως προς  $n$  είναι ευθεία γραμμή με κλίση  $(\varphi - 1)$ . Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν οι υποθέσεις που κάναμε ήταν σωστές. Εάν μια τέτοια γραφική παράσταση δεν είναι γραμμική τότε οι υποθέσεις που κάναμε πιο πάνω ήταν λάθος.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί η δυνατότητα χρήσης ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών με τα οποία μπορεί να γίνει προσαρμογή τέτοιων παραμετρικών συναρτήσεων, όπως οι διάφορες απλοποιημένες μορφές (υποδείγματα) της εξίσωσης GBK σε πειραματικά δεδομένα και να προσδιοριστούν οι τιμές των παραμέτρων τους. Οι παραμετρικές εξισώσεις μπορεί να είναι γραμμικές ή ακόμη και μη γραμμικές γ'αυτό επιλέγεται η εξίσωση που προσαρμόζεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα. Αυτός είναι και ο πιο εύκολος, γρήγορος και αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό του αριθμού των πρωτονίων που συνεισφέρουν στο Ι.Φ.Δ. καθώς επίσης και των ισοτοπικών τους παραγόντων κλασμάτωσης  $\varphi$ .

## 2A.5.2 Προσδιορισμός της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ σε διάφορα μίγματα $H_2O/D_2O$

Προσδιορίστηκε η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  σε μίγματα  $H_2O/D_2O$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού  $n$ ), της υδρόλυσης του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την παγκρεατική ελαστάση χοίρου (PPE). Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, διαφορετικού ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$ . Για τη ρύθμιση της τιμής pL (όπου L = H ή D) αυτών των ρυθμιστικών διαλυμάτων, ελήφθη υπόψη η σχέση  $pD = \text{ένδειξη πεχαμέτρου} + 0.40$ . Τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, σε μίγματα  $H_2O/D_2O$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο, παρασκευάστηκαν σταθμικά από δύο ισοδύναμα (ως προς τις αντίστοιχες τιμές pH ή pD) ρυθμιστικά διαλύματα, με διαλύτη  $H_2O$  ή  $D_2O$ , αντίστοιχα. Το καθένα από αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη  $H_2O$  ή  $D_2O$  παρασκευάστηκε χωριστά και μετρήθηκε η τιμή pL αυτών, επίσης χωριστά. Ειδικότερα, για τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη  $D_2O$  και για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου ατομικού κλάσματος δευτερίου, ελήφθησαν υπόψη και οι ποσότητες των περιεχομένων πρωτονίων κάθε τυχόν επιβάρυνσης από τα άλατα  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ . Συνολικά παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών με ατομικά κλάσματα δευτερίου  $n = \{0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 0.99\}$ .

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερωμένης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA. Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων (δηλαδή για κάθε διαφορετική τιμή ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$ ) χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30 \text{ nM}$ , το υπόστρωμα Suc-AAAI-pNA σε συγκεντρώση ( $[S] \ll K_m = 120 \text{ } \mu\text{M}$ ) για να διαπιστώσουμε τη μεταβολή της κινητικής παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  σε μίγματα  $H_2O/D_2O$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο.

## 2A.6 Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων της PPE με αντιστρεπτούς αναστολείς

### 2A.6.1 Μελέτες υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων στην ενεργό περιοχή της PPE

Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σε λειτουργικό σύστημα Linux (Linux Platform), χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πακέτο Schrödinger Software suite, ver. 2014- 4 LLC (New York, NY). Δεδομένου ότι η τυπική δομή των πρωτεϊνών που λαμβάνονται από τα αρχεία PDB δεν είναι κατάλληλη για άμεση χρήση στους υπολογισμούς της μοριακής πρόσδεσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε προετοιμασία της πρωτεΐνης με την χρήση του εργαλείου Protein Preparation Wizard 2013-2, του προγράμματος Glide. Συγκεκριμένα, η κρυσταλλική δομή της PPE (PDB ID: 7EST) τροποποιήθηκε αφαιρώντας τον αναστολέα και ρυθμίζοντας την τιμή pH ( $7.5 \pm 0.5$ ), ώστε να προσομοιάζει καλά τις συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου, στις οποίες πραγματοποιούνται τα *in vitro* πειράματα. Ακολούθησε προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειας.

Αντίστοιχα, η απεικόνιση των μοριακών δομών των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών ανιλιδίων σε δισδιάστατη και τρισδιάστατη μορφή γίνεται χρησιμοποιώντας τις εφαρμογές Build και LigPrep. Στην εφαρμογή LigPrep γίνεται ο ιονισμός των ενώσεων σε μία δεδομένη τιμή pH, η δημιουργία των ταυτομερών και των στερεοϊσομερών. Η προετοιμασία των μορίων περιλαμβάνει την δημιουργία πολλαπλών διαμορφώσεων με την εφαρμογή ConfGen η οποία χρησιμοποιεί μια συνδυασμένη αναζήτηση πολλαπλών ελαχίστων Monte Carlo (Monte Carlo Multiple Minimum) με αναζήτηση Χαμηλού Επιπέδου (Low Mode search). Τα μόρια ελαχιστοποιούνται με το πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005. Χρησιμοποιήθηκε η λεπτομερής αναζήτηση (“Advanced Search”) στο διαμορφωτικό χώρο για την εύρεση κατάλληλων διαμορφώσεων (Comprehensive Search Strategy), επιτρέποντας μόνο τις trans διαμορφώσεις του πεπτιδικού δεσμού, επιλέγοντας το H<sub>2</sub>O ως διαλύτη και τον αλγόριθμο ελαχιστοποίησης βαθμιδωτής σύζευξης (truncated Newton conjugate gradient, TNCG) με 100 επαναλήψεις (iterations). Στη συνέχεια ορίστηκε το τρισδιάστατο πλέγμα, το οποίο θα αποτελέσει στην ουσία το διάστημα διαμόρφωσης στο οποίο θα γίνει

η πρόσδεση των μορίων. Ο διαμορφωτικός χώρος στον οποίο έγινε η πρόσδεση των ενώσεων ορίστηκε ως ένας κύβος διαστάσεων  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$ , με κέντρο τον αναστολέα (συντεταγμένες  $X = 14.1462$ ,  $Y = 48.1472$  και  $Z = -1.1562$ ).

Το σύνολο των διαμορφώσεων που προέκυψαν για κάθε αναστολέα, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του τρόπου και της ενέργειας πρόσδεσης αυτών στην παγκρεατική ελαστάση επιλέγοντας την μέθοδο υψηλής ακριβείας (**extra precision-XP**), του προγράμματος Glide. Η μέθοδος XP προσφέρει μια καλύτερη συσχέτιση ανάμεσα στη γεωμετρία της πρόσδεσης (πόζας) και της βαθμολόγησής της. Τελικά επιλέχθηκαν οι πέντε καλύτερες πόζες για το κάθε σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα βασιζόμενη στην βαθμολόγηση “XP GlideScore”.

### 2A.6.2 Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης

Οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις για κάθε αναστολέα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (με τη χαμηλότερη τιμή XP Gscore) επαναβαθμολογήθηκαν και υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μέσω του προγράμματος Prime και της μεθόδου MM-GBSA (Prime/MM-GBSA - Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area - Prime, version 3.1). Πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας (local optimization feature -Prime) και υπολογίστηκαν οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS-2005, το VSGB μοντέλο επιδιалύτωσης, επιτρέποντας μια εύκαμπτη διαμόρφωση των καταλοίπων του σκελετού της PPE σε απόσταση  $5 \text{ \AA}$  από τον αναστολέα.

### 2A.6.3 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής του συμπλόκου PPE-τριφθοροακετυλοπεπτιδικών ανιλιδίων

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στο ενεργειακά ελαχιστοποιημένο σύμπλοκο PPE-αναστολέα που προέκυψε από την προηγούμενο στάδιο (το σύμπλοκο με το καλύτερο Prime/MM-GBSA score), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Desmond του υπολογιστικού πακέτου Schrödinger Suite. Για την προσομοίωση των μορίων του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο επιδιалυτοποίησης TIP3P με διαλύτη  $\text{H}_2\text{O}$ , σ’

ένα ορθορομβικό κουτί και η απόσταση από τις άκρες τις πρωτεΐνης ορίστηκε στα 10 Å. Προστέθηκαν 7590 μόρια νερού, καθώς και 6 ιόντα Cl<sup>-</sup> για να καταστήσουμε το σύστημα ηλεκτρικά ουδέτερο, ενώ η ιοντική ισχύς ρυθμίστηκε με NaCl στο 0.1 M.

Ακολούθησε ελαχιστοποίηση του συμπλέγματος (τουλάχιστον 10 βήματα), μέχρις ότου η αρμονική σταθερά δύναμης να λάβει την τιμή 104.67 kJ mol<sup>-1</sup>Å<sup>1</sup> και εν συνεχεία εξισορροπήθηκε, χρησιμοποιώντας το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο εξισορρόπησης του Desmond, πριν την προσωμοίωση. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν για 5 ns, σε στατιστικό σύνολο NPT (ισοβαρές-ισόθερμο) ως μικροκανονικό σύστημα με πίεση 1 bar και σταθερή θερμοκρασία 300K, χρησιμοποιώντας βήμα 2 fs για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων. Τέλος, η αποθήκευση των ατομικών συντεταγμένων όλων των ατόμων του συστήματος (trajectories) γινόταν κάθε 5 ps.

## **2A.7 Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας του συμπλόκου PPE-αναστολέα ( $K_i$ ) για τη σειρά των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών π-τριφθορο-ανιλιδίων**

Για τον προσδιορισμό της συγγένειας πρόσδεσης της σειράς των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων στην PPE υπολογίστηκε η σταθερά αστάθειας του συμπλόκου PPE-αναστολέα ( $K_i$ ), η οποία αποτελεί μέτρο αυτής (όσο μικρότερη η τιμή της  $K_i$  τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης του αναστολέα με το ένζυμο). Έτσι, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μετρήσεις με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων σε τιμή pH = 8.00 και σε θερμοκρασία 25°C του μέσου αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, οι οποίες βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου ( $\Delta Abs_{410 \text{ nm}}/\text{min}$ ), κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30 \text{ nM}$  και υπόστρωμα Suc-AAA-pNA, σε σταθερή συγκέντρωση  $[S] = 120 \text{ }\mu\text{M}$  σε διαλύματα DMSO. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση των αναστολέων CF<sub>3</sub>C(O)-DA-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>CO-K-A-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub> και CF<sub>3</sub>CO-V-A-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub> σε πέντε

διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $[I] = \{30, 60, 90, 180, 240 \text{ nM}\}$ ) σε διαλύματα DMSO και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 940 μl ρυθμιστικού διαλύματος 0.1M Tris HCl τιμής pH 8.0, 30 μl DMSO, 10 μl ενζυμικού παρασκευάσματος και 10 μl διαλύματος διαφορετικής κάθε φορά συγκέντρωσης του εκάστοτε αναστολέα. Για λόγους σύγκρισης πριν την προσθήκη του υποστρώματος (10 μl) στο διάλυμα της αντίδρασης, το ένζυμο επωάζονταν 15 min με τον εκάστοτε αναστολέα. Μετά την προσθήκη του υποστρώματος, με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π-νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου ( $\Delta\text{Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$ ). Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης  $> 0.999$ .

Η γνωστή εξίσωση Morrison (2.11), χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων και υπολογίστηκαν οι τιμές  $K_i$  για κάθε αναστολέα οι οποίες και συγκρίθηκαν με προαναφερόμενες στην βιβλιογραφία<sup>187-189</sup>.

$$\alpha = \frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E]_0 + [I]_0 + K_i - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4 [E]_0 [I]_0}}{2 [E]_0} \quad (2.11)$$

## 2A.8 Εξάρτηση της αναστολής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης: μέτρηση της μεταβολής της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα $K_f (= 1/K_i)$

Μελετήθηκε η μεταβολή της σταθεράς αστάθειας  $K_i$  και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα  $K_f (= 1/K_i)$  ως συνάρτηση της τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με τη σειρά των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών ανιλιδίων χρησιμοποιώντας το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA.

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον εκάστοτε αναστολέα σε

ρυθμιστικό διάλυμα ιονικής ισχύος 0.1 M διαφορετικής κάθε φορά τιμής pH και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος  $\lambda = 410$  nm για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30$  nM και το υπόστρωμα Suc-AAA-pNA, σε σταθερή συγκέντρωση  $[S] = 120$   $\mu$ M σε διαλύματα DMSO. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση των αναστολέων CF<sub>3</sub>CO-D-A-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>CO-K-A-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub> και CF<sub>3</sub>CO-V-A-NH-Ph-p-CF<sub>3</sub> σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $[I] = \{30, 60, 90, 180, 240$  nM}) σε μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων με τιμές pH από 5.50 έως 10.50. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 2A.3 και η διαδικασία ήταν όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 2A.7.

Για κάθε τιμή pH υπολογίστηκε η τιμή  $K_i$  για κάθε αναστολέα με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση Morrison όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2A.7. Εν συνεχεία τα πειραματικά δεδομένα  $1/K_i$  συναρτήσε της τιμής του pH προσαρμότηκαν στην εξίσωση (1.12), όπου υπολογίστηκαν δύο τιμές  $pK_a$  μία στην όξινη περιοχή και μια στην αλκαλική περιοχή του προφιλ pH.

## 2A.9 Μέτρηση της μεταβολής της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα $K_f$ ( $= 1/K_i$ ) σε διάφορα μίγματα H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

Μελετήθηκε η μεταβολή της σταθεράς αστάθειας  $K_i$ , της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα  $K_f$  ( $= 1/K_i$ ) και της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  σε μίγματα H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού  $n$ ), της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με τη σειρά των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών ανιλιδίων χρησιμοποιώντας το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA.

Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, σε μίγματα H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο και παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 2A.5.2.



Συνολικά παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών με ατομικά κλάσματα δευτερίου  $n = \{0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 0.99\}$ . Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερουμένης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA. Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της PPE, με τίτλο  $[E]_0 = 30 \text{ nM}$ , το υπόστρωμα Suc-AAA-pNA σε συγκεντρώση  $[S] = 120 \text{ }\mu\text{M}$  και πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων  $\text{CF}_3\text{C(O)-DA-NHPh-p-CF}_3$ ,  $\text{CF}_3\text{C(O)-KA-NHPh-p-CF}_3$ , και  $\text{CF}_3\text{C(O)-VA-NHPh-p-CF}_3$  ( $[I] = \{30, 60, 90, 180, 240 \text{ nM}\}$ ) σε πέντε διαφορετικές τιμές ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$  του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης.

Τα πειραματικά δεδομένα και για τους τρεις αντιστρεπτούς αναστολείς προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Morrison όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2A.7. Εν συνεχεία υπολογίστηκαν οι τιμές της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  και οι τιμές των σταθερών  $K_i$  και  $1/K_i$  ανά αναστολέα και προσαρμόστηκαν σε διάφορες μορφές της εξίσωσης Gross–Butler–Kresge. Παράλληλα προσδιορίστηκαν οι τιμές των παραγόντων κλασμάτωσης καθώς και άλλων κρίσιμων παραμέτρων.

## **2B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ RENNINΗ MPR**

### **2B.1 Υλικά**

#### **2B.1.1 Ένζυμα**

Το ενζυμικό παρασκεύασμα της ρεννίνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αγοράστηκε από την εταιρεία SIGMA (Mucorpepsin, lyophilized, powder, slightly brown, ~0.1 U/mg, 83553 Sigma).

#### **2B.1.2 Χημικά αντιδραστήρια, αμινοξέα και λοιπά**

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες, τα διάφορα άλατα και το βαρύ νερό (D<sub>2</sub>O) αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA.

Τα αμινοξέα, η π-νιτροανιλίνη και το Fmoc-2-αμινο-βενζοϊκό οξύ αγοράστηκαν από τις εταιρείες Bachem Inc., Nova-Biochem και SIGMA. Οι πλαστικές πλάκες, προεπιστρωμένες με Silica gel 60 (Kieselgel F<sub>254</sub>) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany).

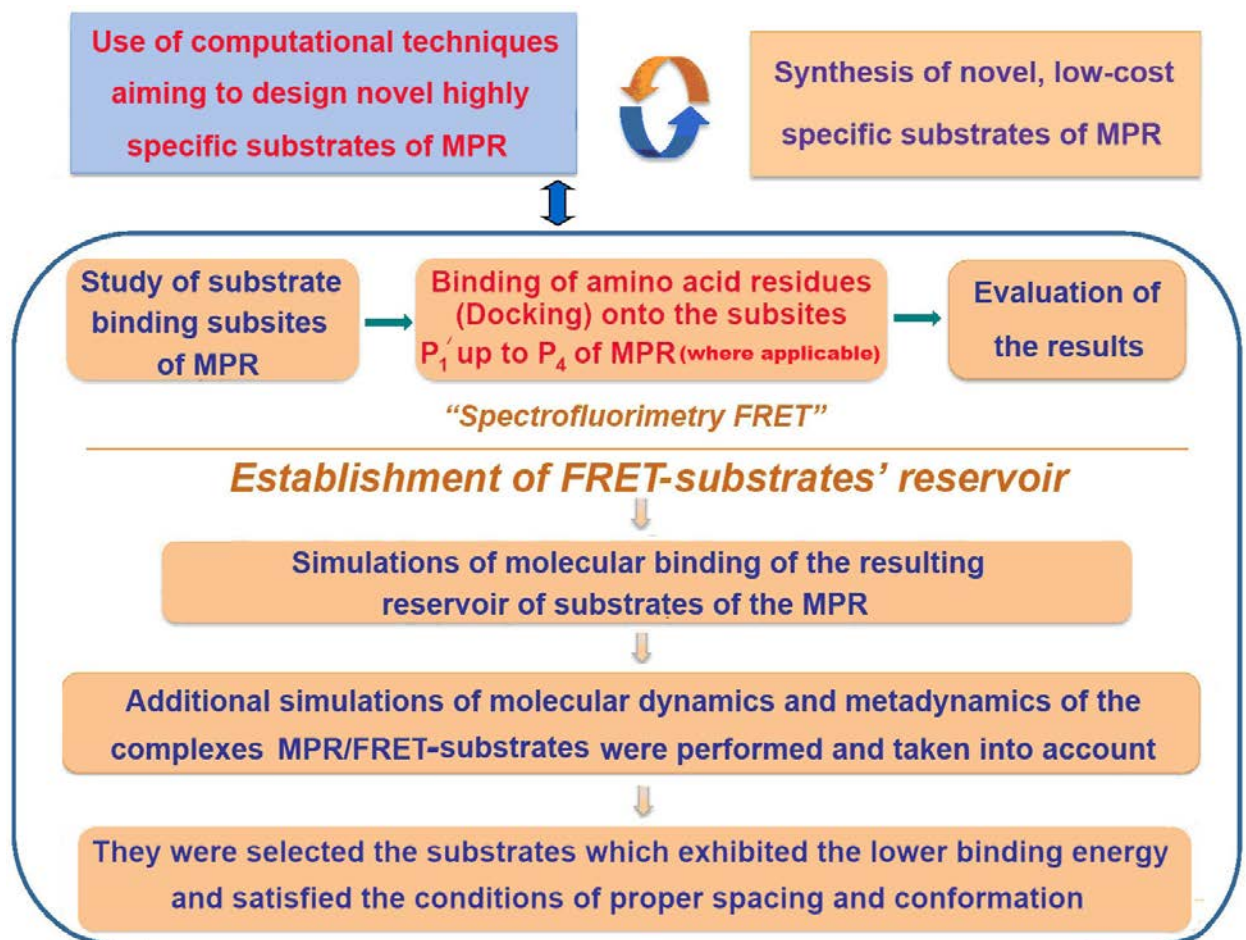
#### **2B.1.3 Υπολογιστικά Προγράμματα**

Χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πακέτο Schrödinger Software suite, ver. 2014- 4 LLC (New York, NY) για την πραγματοποίηση προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής. Για την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και την γραφική παράσταση αυτών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Microcal Origin 8.0.

## **2B.2 Χρήση υπολογιστικών τεχνικών για το σχεδιασμό υποψήφιων υποστρωμάτων και την μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους με την MPR**

Για την εύρεση και το σχεδιασμό υποψήφιων μορίων ως υποστρωμάτων του ενζύμου MPR πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη της βιβλιογραφίας και αξιοποιήθηκαν δεδομένα από υπάρχοντα υποστρώματα της MPR και πληροφορίες σχετικά με το καταλυτικό κέντρο και το μηχανισμό δράσης της

MPR και άλλων ασπαρτικο-πρωτεϊνών. Εν συνεχεία με την βοήθεια τεχνικών μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκαν *in silico* μελέτες της ικανότητας και του τρόπου πρόσδεσης των μορίων αυτών στο ενεργό κέντρο της MPR για την εύρεση των καλύτερων υποψήφιων μορίων-υποστρωμάτων για το ένζυμο αυτό. Συνοπτικά, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα, ενώ ακολουθεί και λεπτομερής περιγραφή των σταδίων αυτών.



**Σχήμα 2.1:** Μεθοδολογία εύρεσης, σχεδιασμού και ταυτοποίησης υποψήφιων μορίων ως υποστρωμάτων του ενζύμου MPR.

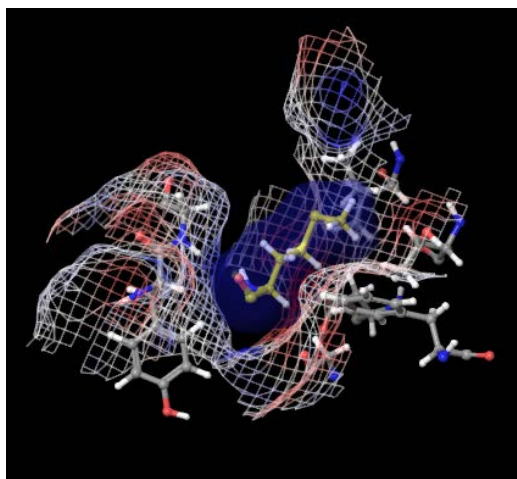
### 2B.2.1 Μελέτη των υποπεριοχών πρόσδεσης υποστρώματος της MPR

Το πρώτο στάδιο για το σχεδιασμό νέων πεπτιδικών υποστρωμάτων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας και την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της ρεννίνης από τον μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus* ήταν η μελέτη των υποπεριοχών πρόσδεσης του υποστρώματος του ενζύμου αυτού.

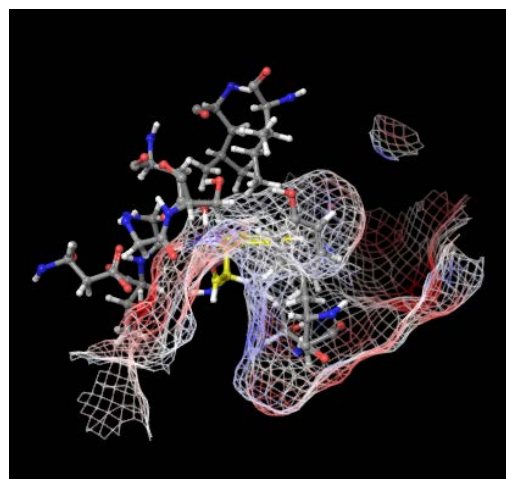
Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα κρίσιμα κατάλοιπα τα οποία συνιστούν τις υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος και συμβάλλουν πραγματοποιώντας σημαντικές επαφές κατά καταλυτική διαδικασία.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν δεδομένα που προέρχονται από κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου αυτού με διάφορους αναστολείς καθώς και από μελέτες προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης με ανάλογα του φυσικού υποστρώματος κ-καζεΐνη, αλλά και από την σύγκριση της MPR με άλλες ασπαρτικοπρωτεΐνάσες. Από την κρυσταλλογραφική μελέτη του Newman και των συνεργατών του και την σύγκριση των υποπεριοχών πρόσδεσης της MPP με την πεψίνη χοίρου και την rhizopuspepsin που πραγματοποίησαν, αναδεικνύονται και επισημαίνονται σημαντικά κατάλοιπα στις περιοχές δέσμευσης του υποστρώματος. Ιδιαίτερα διαφωτιστικές ήταν και οι προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης που πραγματοποιήθηκαν με δύο θραύσματα ανάλογα της κ-καζεΐνης με σκοπό την μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών.

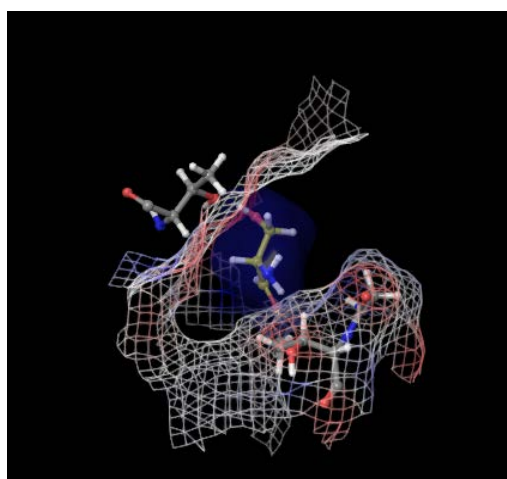
Στα σχήματα που ακολουθούν (**Σχήμα 2.2α-ε**) παρουσιάζονται οι υποπεριοχές πρόσδεσης του ενζύμου MPR και τα κρίσιμα κατάλοιπα με τα οποία αλληλεπιδρά το υπόστρωμα. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το θραύσμα HLSFM της κ-καζεΐνης, ενώ η κρυσταλλική δομή της ρεννίνης ελήφθησε από την βάση κρυσταλλογραφικών δεδομένων των πρωτεϊνών PDB (κωδικός πρόσβασης PDBID: 1MPP). Τα μοντέλα αυτά παρήχθησαν με την χρήση του προγράμματος Glide του υπολογιστικού πακέτου Schrödinger Software suite, ver. 2014- 4 LLC (New York, NY).



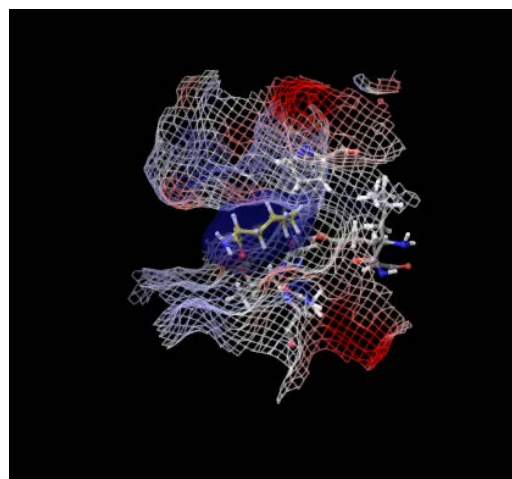
S<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' : G<sup>34</sup> Y<sup>75</sup> G<sup>76</sup> F<sup>189</sup> T<sup>213</sup> D<sup>215</sup> I<sup>300</sup>



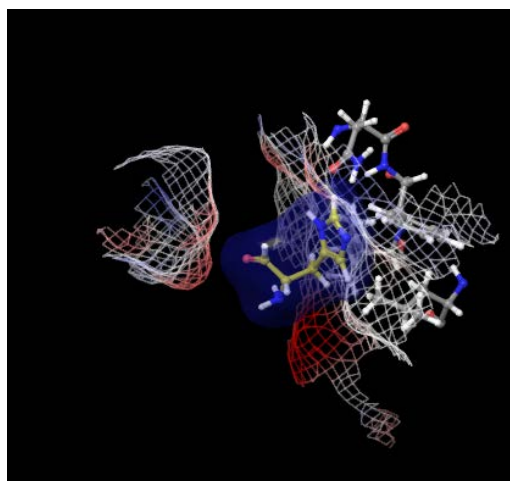
S<sub>1</sub>-P<sub>1</sub> : L<sup>30</sup> D<sup>32</sup> G<sup>34</sup> S<sup>35</sup> Y<sup>75</sup> T<sup>77</sup> P<sup>111</sup> I<sup>120</sup> D<sup>215</sup> G<sup>217</sup> T<sup>218</sup>



S<sub>2</sub>-P<sub>2</sub> : G<sup>76</sup> T<sup>77</sup> T<sup>218</sup>



S<sub>3</sub>-P<sub>3</sub> : D<sup>11</sup> L<sup>11A</sup> E<sup>13</sup> P<sup>111</sup> G<sup>217</sup> T<sup>218</sup> N<sup>219</sup>



S<sub>4</sub>-P<sub>4</sub> : N<sup>219</sup> F<sup>220</sup> I<sup>222</sup> L<sup>287</sup>

**Σχήμα 2.2α-ε:** Υποπεριοχές πρόσδεσης του ενζύμου MPR και κρίσιμα κατάλοιπα με τα οποία αλληλεπιδρά το υπόστρωμα HLSFM

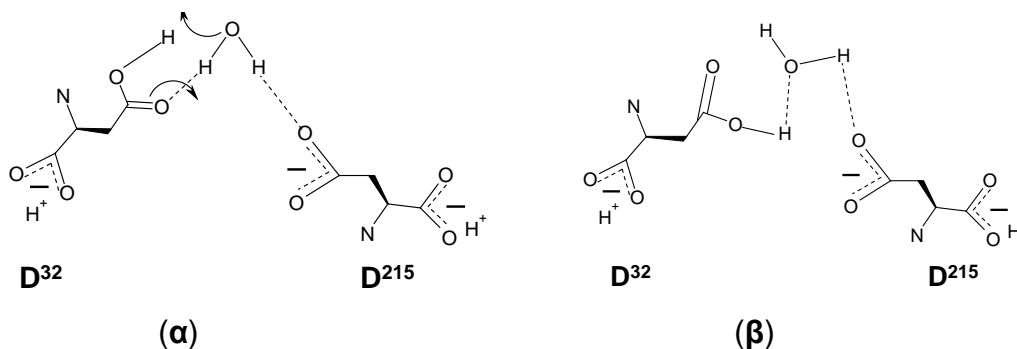
Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη των υποπεριοχών πρόσδεσης υποστρώματος, αλλά και από μελέτη του καταλυτικού κέντρου της ρεννίνης MPR, αλλά και άλλων ασπαρτικοπρωτεϊνών, προχωρήσαμε στο σχεδιασμό φθορισμομετρικών πεπτιδικών παραγώγων (FRET-πεπτιδίων), που βασίζονται στην μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster, δεδομένων των εξαιρετικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Πιο συγκεκριμένα σχεδιάστηκαν παράγωγα της γενικής μορφής Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-pNa, Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-pNa και Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>-pNa, έτσι ώστε να συμπληρώνεται η μέγιστη δυνατή αλληλουχία του τύπου P<sub>4</sub>P<sub>3</sub>P<sub>2</sub>P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'P<sub>2</sub>'. Για όλα τα παράγωγα, στην θέση P<sub>2</sub>' επιλέχθηκε η ομάδα -pNa, ενώ στο άμινο-τελικό άκρο (θέσεις P<sub>5</sub>-P<sub>3</sub>) επιλέχθηκε η ομάδα Abz-. Στις υπόλοιπες θέσεις δοκιμάστηκαν κατάλοιπα ως εξής: (α) θέση P<sub>1</sub>': Y, F και I, (β) θέση P<sub>1</sub>: F και Y, (γ) θέση P<sub>2</sub>: S, G και T, (δ) θέση P<sub>3</sub>: N και Q, εκτός και αν στην θέση αυτή υπάρχει η ομάδα Abz-, σύμφωνα με τα παραπάνω και (ε) θέση P<sub>4</sub>: F, Y και G, εκτός και αν στην θέση αυτή υπάρχει η ομάδα Abz-, σύμφωνα με τα παραπάνω. Ακολούθησαν μελέτες υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων αυτών στην ενεργό περιοχή της MPR.

### 2B.2.2 Μελέτες Προσομοιώσεων Μοριακής Πρόσδεσης των FRET-πεπτιδίων στην MPR

Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σε λειτουργικό σύστημα Linux (Linux Platform), χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πακέτο Schrödinger Software suite, ver. 2014- 4 LLC (New York, NY).

Η κρυσταλλική δομή της MPR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ελήφθη από την βάση κρυσταλλογραφικών δεδομένων των πρωτεϊνών PDB (κωδικός πρόσβασης PDBID: 1MPP). Αρχικά πραγματοποιήθηκε προετοιμασία της πρωτεΐνης με την χρήση του εργαλείου Protein Preparation Wizard 2013-2, του προγράμματος Glide. Συγκεκριμένα, οι προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με έξι τροποποιημένες μορφές της κρυσταλλικής δομής 1MPP: (i) με 63 μόρια H<sub>2</sub>O και με τις διαμορφώσεις (α) και (β) του καταλυτικού H<sub>2</sub>O (Σχήμα 2.3), (ii) με 7 μόρια H<sub>2</sub>O και με τις διαμορφώσεις (α) και (β) του καταλυτικού H<sub>2</sub>O και (iii)

μόνο με το καταλυτικό μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{O}_{527}$ ) στις διαμορφώσεις (α) και (β). Κατά την προετοιμασία και των έξι δομών της πρωτεΐνης η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 4.5 ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου, ακολούθησε προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση των δομών και ελαχιστοποίηση της ενέργειας.



**Σχήμα 2.3α-β:** Διαμορφώσεις του καταλυτικού μορίου  $\text{H}_2\text{O}$  στην δομή της MPR

Αντίστοιχα, η απεικόνιση των μοριακών δομών των FRET-πεπτιδίων σε δισδιάστατη και τρισδιάστατη μορφή γίνεται χρησιμοποιώντας τις εφαρμογές Build και LigPrep. Στην εφαρμογή LigPrep γίνεται ο ιονισμός των ενώσεων σε σε τιμή pH 4.5, η δημιουργία των ταυτομερών και των στερεοϊσομερών. Η προετοιμασία των μορίων περιλαμβάνει την δημιουργία πολλαπλών διαμορφώσεων με την εφαρμογή ConfGen η οποία χρησιμοποιεί μια συνδυασμένη αναζήτηση πολλαπλών ελαχίστων Monte Carlo (Monte Carlo Multiple Minimum) με αναζήτηση Χαμηλού Επιπέδου (Low Mode search). Τα μόρια ελαχιστοποιούνται με το πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005. Χρησιμοποιήθηκε η λεπτομερής αναζήτηση (“Advanced Search”) στο διαμορφωτικό χώρο για την εύρεση κατάλληλων διαμορφώσεων (Comprehensive Search Strategy), επιτρέποντας μόνο τις trans διαμορφώσεις του πεπτιδικού δεσμού, επιλέγοντας το  $\text{H}_2\text{O}$  ως διαλύτη και τον αλγόριθμο ελαχιστοποίησης βαθμιδωτής σύζευξης (truncated Newton conjugate gradient, TNCG) με 100 επαναλήψεις (iterations). Στην συνέχεια, ορίστηκε το τρισδιάστατο πλέγμα, το οποίο θα αποτελέσει στην ουσία το διάστημα διαμόρφωσης στο οποίο θα γίνει η πρόσδεση των μορίων. Ο διαμορφωτικός χώρος στον οποίο έγινε η πρόσδεση των ενώσεων ορίστηκε ως ένας κύβος διαστάσεων  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$ , με κέντρο τα δύο καταλυτικά κατάλοιπα

ασπαρτικού οξέος (D<sup>32</sup> και D<sup>215</sup>) και συντεταγμένες  $X = 1.65$ ,  $Y = 2.16$  και  $Z = 1.08$ .

Το σύνολο των διαμορφώσεων που προέκυψαν για κάθε FRET-παράγωγο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του τρόπου και της ενέργειας πρόσδεσης αυτών και στις έξι δομές του υποδοχέα 1MPP, επιλέγοντας την μέθοδο απλής ακριβείας (SP-standard precision) του προγράμματος Glide, δεδομένου του μεγάλου όγκου των υπολογισμών. Από την διαδικασία αυτή επιλέχθηκε η δομή του υποδοχέα η οποία δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα (docking score, απόσταση από το καταλυτικό H<sub>2</sub>O, θέση των υποκαταστατών). Ακολούθησαν υπολογισμοί, επιλέγοντας την μέθοδο υψηλής ακριβείας (extra precision-XP), του προγράμματος Glide, χρησιμοποιώντας την δομή της MPR με 63 μόρια H<sub>2</sub>O και με την διαμόρφωση (α) του καταλυτικού H<sub>2</sub>O. Τελικά επιλέχθηκαν οι τρεις καλύτερες πόζες για το κάθε σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος με βάση βαθμολόγηση XP GlideScore.

### **2B.2.3 Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης για το κάθε σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος**

Οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις για κάθε υπόστρωμα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (με τη χαμηλότερη τιμή XP Gscore) επαναβαθμολογήθηκαν και υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μέσω του προγράμματος και της μεθόδου Prime/MM-GBSA. Πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας (local optimization feature - Prime) και υπολογίστηκαν οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS-2005, το VSGB μοντέλο επιδιάλυψης, επιτρέποντας μια εύκαμπτη διαμόρφωση των καταλοίπων του σκελετού της PPE σε απόσταση 5Å από το εκάστοτε υπόστρωμα.



#### **2B.2.4 Μελέτες Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των συμπλόκων MPR-υποστρωμάτων**

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στα ενεργειακά ελαχιστοποιημένα σύμπλοκα MPR-υποστρωμάτων που προέκυψαν από την προηγούμενο στάδιο (το σύμπλοκο με το καλύτερο Prime/MM-GBSA score για κάθε FRET-πεπτιδικό υπόστρωμα), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Desmond του υπολογιστικού πακέτου Schrödinger Suite. Για την προσομοίωση των μορίων του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο επιδιαλυτοποίησης TIP3P με διαλύτη H<sub>2</sub>O, σ' ένα ορθορομβικό κουτί κι η απόσταση από τις άκρες τις πρωτεΐνης ορίστηκε στα 8 Å. Προστέθηκαν 8383 μόρια νερού, καθώς και 14 ιόντα Na<sup>+</sup> για να καταστήσουμε το σύστημα ηλεκτρικά ουδέτερο, ενώ η ιοντική ισχύς ρυθμίστηκε με NaCl στο 0.1 M.

Ακολούθησε ελαχιστοποίηση του συμπλέγματος (τουλάχιστον 10 βήματα) και στην συνεχεία αυτό εξισορροπήθηκε, χρησιμοποιώντας το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο εξισορρόπησης του Desmond, πριν από την προσομοίωση. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν για 4 ns, σε στατιστικό σύνολο NPT (ισοβαρές-ισόθερμο) ως μικροκανονικό σύστημα με πίεση 1 bar και σταθερή θερμοκρασία 300K, χρησιμοποιώντας βήμα 2 fs για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων. Τέλος, η αποθήκευση των ατομικών συντεταγμένων όλων των ατόμων του συστήματος (trajectories) γινόταν κάθε 5ps.

#### **2B.2.5 Προσομοιώσεις Μεταδυναμικής των καλύτερων συμπλόκων MPR-FRET πεπτιδίων**

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μεταδυναμικής, για τα καλύτερα σύμπλοκα, MPR-FRET πεπτιδίων, με χρήση του προγράμματος Desmond.

Η Μεταδυναμική (MTD ή METAD ή MetaD) είναι μια τεχνική επιταχυνόμενης προσομοίωσης που μπορεί να εφαρμοστεί μετά την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής για να ενισχύσει την δειγματοληψία διαμορφώσεων (διαμορφωτικών καταστάσεων) και να βρει πιθανές σταθερές ή μετα-σταθερές καταστάσεις ενός εργοδικού συστήματος

(που γενικά έχει ίδια μέση συμπεριφορά σε χρόνο και χώρο), δηλαδή διεγερμένες καταστάσεις ατόμων ή πυρήνων ατόμων κλπ, με μεγαλύτερο χρόνο ζωής από αυτόν των κανονικών διεγερμένων καταστάσεων, αλλά με πολύ μικρότερο χρόνο ζωής σε σύγκριση με τις σταθερές καταστάσεις<sup>190-194</sup>.

Η δειγματοληψία διαμορφώσεων θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα ικανοποιητικά μεγάλο δείγμα, αντιπροσωπευτικό των μέσων στατιστικών ιδιοτήτων όλης της πορείας που θα ακολουθηθεί και μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για την ανακατασκευή της επιφάνειας της ελεύθερης ενέργειας (FES) ως προς ένα σύνολο (set) αξιόπιστων επιλεγμένων ομαδικών μεταβλητών (CVs) όπως είναι οι αποστάσεις ατόμων, οι γωνίες στρέψης, κλπ). Αυτές οι μεταβλητές είναι γεωμετρικές παράμετροι οι οποίες θα πρέπει να είναι ικανές να διαχωρίζουν διαφορετικές σταθερές ή μετα-σταθερές καταστάσεις και να περιγράφουν τα αργά συμβάντα (μεταβολές μήκους δεσμών, γωνιών στρέψης κλπ) που συνδέονται κατευθείαν με τα μελετώμενα φαινόμενα και να είναι όσον το δυνατόν λιγότερες<sup>192-194</sup>.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν η μεταβλητή **CV1** που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του οξυγόνου του καταλυτικού μορίου H<sub>2</sub>O και η μεταβλητή **CV2** η οποία αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του υδρογόνου της οπής οξυανιόντος (**G76**) για το υπό μελέτη σύστημα και πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις μεταδυναμικής για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας (FES). Αρχικά το σύστημα εξισορροπήθηκε χρησιμοποιώντας το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο εξισορρόπησης του Desmond, πριν τις προσομοιώσεις μεταδυναμικής οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για 5 ns, σε στατιστικό σύνολο NPT με πίεση 1 bar και σταθερή θερμοκρασία 300K. Ένα παραβιασμένο δυναμικό κατά Gauss με ύψος 0.03 kcal/mol εφαρμόστηκε ανά διαστήματα 0.09 ps κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και τελικά χρησιμοποιώντας το εργαλείο «Desmond Metadynamics Analysis tool» ανακατασκευάστηκε η επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) από αυτές τις Γκαουσιανές συναρτήσεις (Gaussian Functions).

## 2B.3 Πεπτιδική Σύνθεση των φθορισμομετρικών παραγώγων (FRET πεπτιδίων)

### 2B.3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε η πορεία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για την σύνθεση φθορισμομετρικών πεπτιδικών υποστρωμάτων της MPR είναι η κλασική Fmoc/t-butyl, σταδιακή σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση με την μεθοδολογία των μεικτών ανυδριτών. Η αλληλουχία καθώς και τα μοριακά τους βάρη φαίνονται στον **Πίνακα 2.1**.

**Πίνακας 2.1** : Αλληλουχία και μοριακά βάρη των προς σύνθεση FRET-πεπτιδίων

Όνομασία	Αλληλουχία	MB
FS1	Abz-Gly-Phe-Tyr-pNA	624.65
FS2	Abz-Ser-Phe-Tyr-pNA	654.67
FS3	Abz-Gly- Asn-Ser-Phe-Tyr-pNA	825.83
FS4	Abz-Gly-Phe-Ile-pNA	574.63

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν στην πεπτιδική σύνθεση μετά από διαδικασία καθαρισμού με απόσταξη και αφυδάτωση. Η γενική πορεία της πεπτιδικής σύνθεσης περιελάμβανε τις ακόλουθες διαδικασίες, όπου αυτό ήταν επιβεβλημένο, (α) την παροδική προστασία και αποπροστασία των α-αμινομάδων, (β) την παροδική προστασία, αποπροστασία και ενεργοποίηση των α-καρβοξυλίων και (γ) τις συζεύξεις μεταξύ αμινοξέων ή αμινοξέων - πεπτιδίων.

Για την N<sub>α</sub>- αμινο-παροδική προστασία των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε η 9-Φλουορενυλ-μεθοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) παράλληλα κυρίως με την τριτοταγή βουτυλομάδα (tButyl) για την προστασία των πλευρικών ομάδων, εκτός από την περίπτωση του αμινοξέος N, όπου χρησιμοποιήθηκε η τριτυλομάδα (Ttt). Η Fmoc ομάδα, μετά το τέλος της σύζευξης, απομακρυνόταν με διαιθυλαμίνη σε άνυδρο DCM.

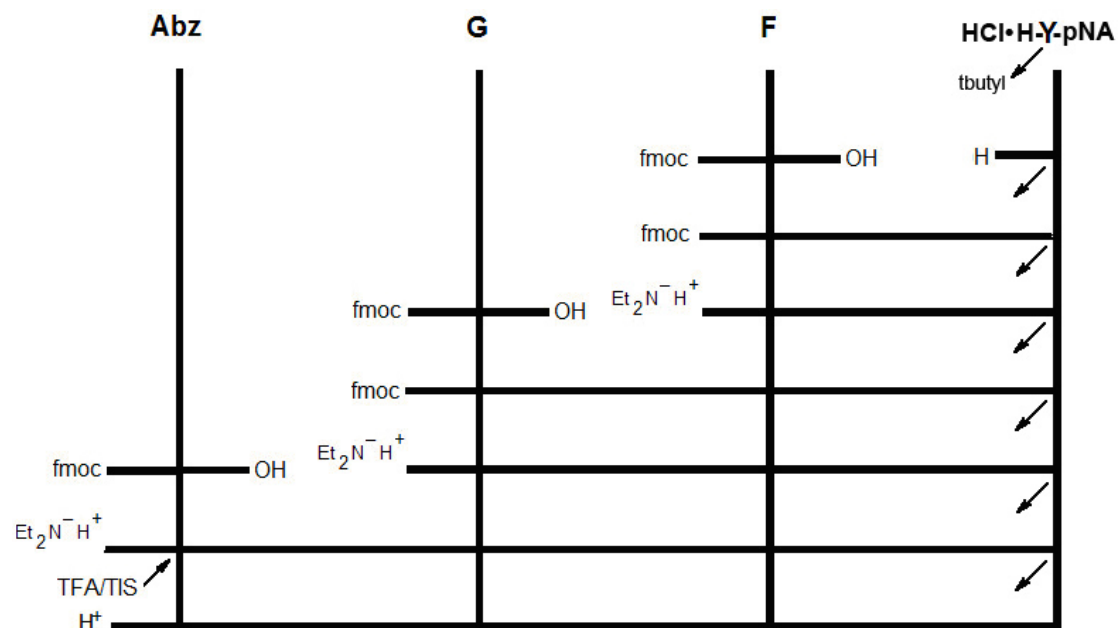
Όλες οι συμπυκνώσεις μέχρι ξηρού πραγματοποιήθηκαν με απόσταξη υπό κενό σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (flash evaporator) Ο έλεγχος της καθαρότητας των ενδιάμεσων και των τελικών ενώσεων που συντέθηκαν

έγινε, κυρίως, με τη βοήθεια χρωματογραφιών λεπτής στοιβάδας, σε φθορίζουσες πλάκες πυριτικού οξέος, που αναπτύχθηκαν στα παρακάτω συστήματα διαλυτών:

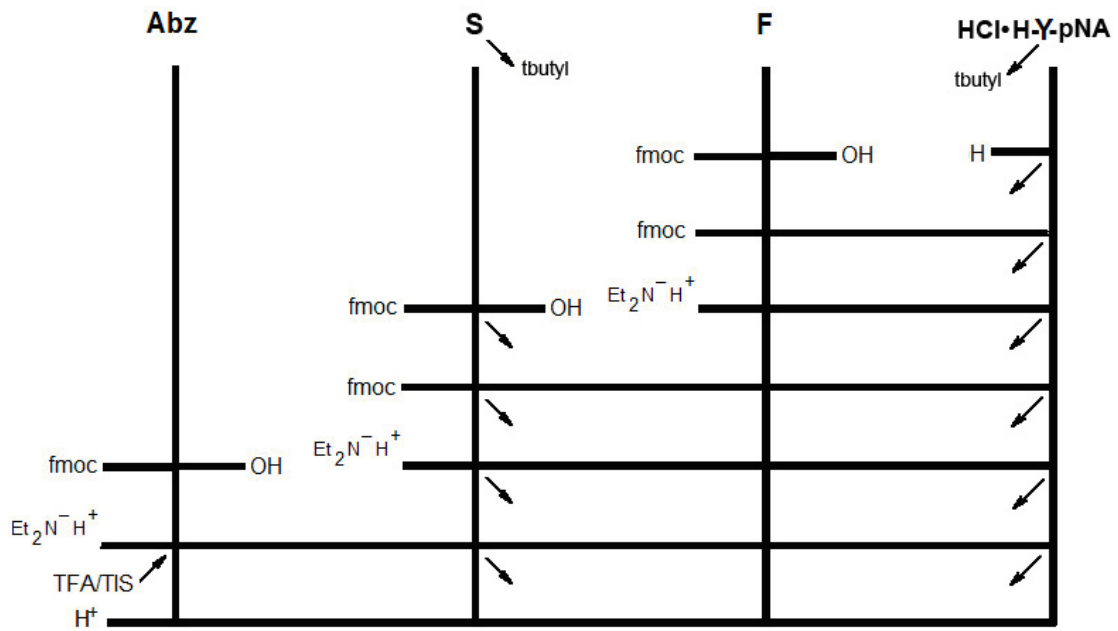
(XM1) Χλωροφόρμιο/μεθανόλη	(1:1 v/v)
(XM2) Χλωροφόρμιο/μεθανόλη	(2:1 v/v)
(XM3) Χλωροφόρμιο/μεθανόλη	(3:1 v/v)
(XTM) Χλωροφόρμιο/τετραχλωράνθρακας/μεθανόλη	(6:3:1 v/v)
(XMΔ) Χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διίσοπροπυλαιθέρας	(9:1:1 v/v)
(OM) Οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη	(9:1 v/v)

Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται με υπεριώδη ακτινοβολία ή ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα νινυδρίνης (0.1 g νινυδρίνης σε 33.3 ml 1-βουτανόλης και θέρμανση για 5 min στους 100°C. Οι περισσότερες πολικές ενώσεις συγκρατούνται ισχυρότερα από το επίσης πολικό υλικό της πλάκας (silica gel) σε σχέση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις. Με την TLC παρακολουθείται η πορεία των αντιδράσεων ταχύτατα και με χαμηλό κόστος.

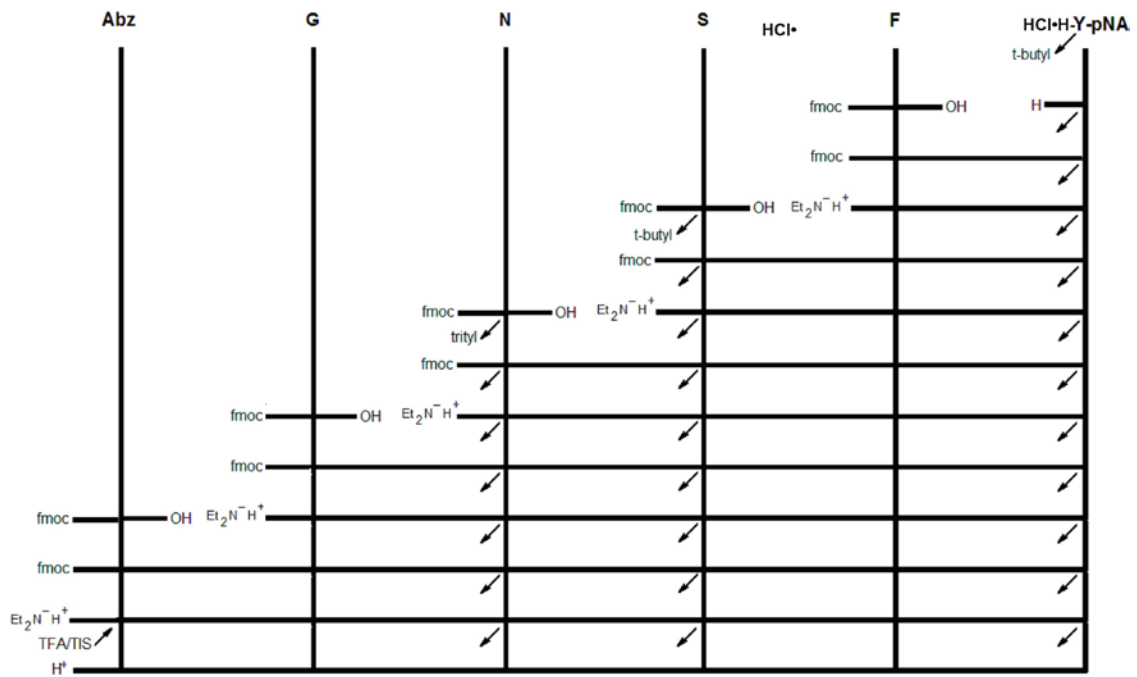
Η σύνθεση των πεπτιδικών υποστρωμάτων Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA, Abz-GNSFY-pNA, και Abz-GFI-pNA έγινε σύμφωνα με τα συνθετικά Σχήματα 2.4- 2.7 αντίστοιχα.



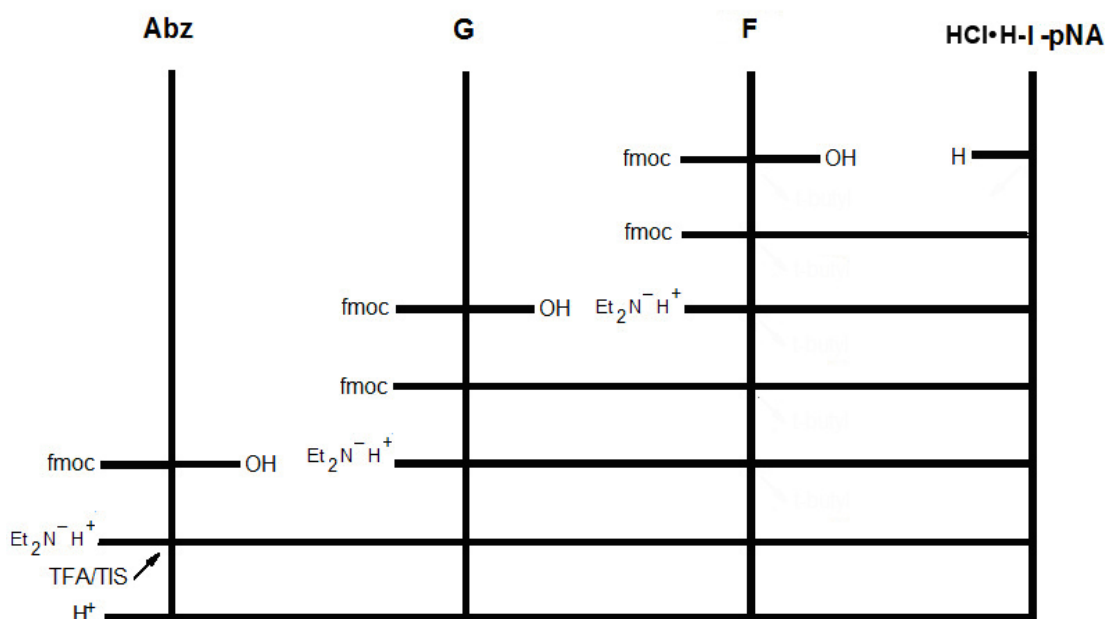
Σχήμα 2.4: Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GFY-pNA (FS1)



Σχήμα 2.5: Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-SFY-pNA (FS2)



Σχήμα 2.6: Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GNSFY-pNA (FS3)



Σχήμα 2.7: Γενικό σχήμα σύνθεσης του παραγώγου Abz-GFI-pNA (FS4)

### 2B.3.2 Σύνθεση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA(FS1)

#### • Απομάκρυνση της Fmoc-N $\alpha$ Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Y(tButyl)-pNA

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.5 g Fmoc-Y(tBu)-pNA (2.59 mmoles), διαλύονται σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (104 mmoles, 11 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.89 g (2.48 mmoles) 95.7%**

#### • Ενεργοποίηση του Fmoc-F-OH και Σύζευξη με το H-Y(tButyl)-pNA

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 0.915 g Fmoc-F-OH (2.36 mmoles) διαλύονται σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται

στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.25 ml N-μεθυλομορφολίνης (2.50 mmol) και 0.45 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (2.48 mmol) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ .

Ακολουθεί προσθήκη 0.89 g H-Y(tButyl)-pNA (2.48 mmol), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη.

Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - άνυδρου διαιθυλαιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.55 g (2.13 mmol) 90%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N $\alpha$  Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.55 g Fmoc-FY(tButyl)-pNA (2.13 mmol), διαλύονται σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (85 mmol, ~9 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1g (2.00mmol) 93.8%**

• **Ενεργοποίηση του Fmoc-G-OH και Σύζευξη με το H-FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.565 g Fmoc-G-OH (1.90 mmoles) διαλύονται σε 10 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.195 ml N-μεθυλομορφολίνης (1.95 mmoles) και 0.37 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (2.00 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ .

Ακολουθεί προσθήκη 1.00 g H-FY(tButyl)-pNA (2.00 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.41g (1.8 mmoles) 94.7%**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-GFY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.41 g Fmoc-GFY(tButyl)-pNA (1.8 mmoles), διαλύονται σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (72 mmoles, ~7.5 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι



ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.94 g (1.67 mmoles) 92.7%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-2-aminobenzoic acid και Σύζευξη με το H-GFY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.571 g Fmoc-2-aminobenzoic acid (1.59 mmoles) διαλύονται σε 10 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.160 ml N-μεθυλομορφολίνης (1.62 mmoles) και 0.30 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (1.67 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ .

Ακολουθεί προσθήκη 0.94g H-GFY(tButyl)-pNA (1.67 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.317 g (1.43 mmoles) 89.93%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Abz-GFY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.317 g Fmoc-Abz-GFY(tButyl)-pNA (1.43 mmoles), διαλύονται σε 15 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (57.2 mmoles, ~6.1 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.91 g (1.3 mmoles) 90.9%**

**• Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και παραγωγή του Abz-GFY-pNA (FS1)**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml τοποθετείται όλη η ποσότητα του Fmoc-Abz-GFY(tButyl)-pNA (0.91g -1.3 mmoles), προστίθενται 20 ml διαλύματος αποκοπής (18.6 ml TFA, 0.8 ml TIS, 0.2 ml H<sub>2</sub>O, 0.1 g φαινόλης) κι η αντίδραση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~180 min, αναδεύοντας κατά διαστήματα. Από τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται το τρισσοπροπυλοσιλάνιο και το H<sub>2</sub>O παίζουν το ρόλο των δεσμευτικών ουσιών (scavengers) με σκοπό να δεσμεύσουν τα κατιόντα που προκύπτουν από την tButyl, τα οποία θεωρούνται παραπροϊόντα της αντίδρασης και θα μπορούσαν να δώσουν παράπλευρες αντιδράσεις, ενώ η φαινόλη χρησιμοποιείται για την προστασία του δακτυλίου της τυροσίνης.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί εξάτμιση (flash evaporator), προσθήκη διαιθυλαιθέρα και ξανά εξάτμιση (flash evaporator). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για δύο φορές ακόμα. Τέλος, Το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη διαιθυλαιθέρα σε παγόλουτρο, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.687g (1.1mmoles) 84.6%, Ολική απόδοση: 42.5%**

### 2B.3.3 Στάδια σύνθεσης των υποστρωμάτων FS2 και FS3

Δεδομένου ότι η αλληλουχία των παραγώγων Abz-SFY-pNA (FS2) και Abz-GNSFY-pNA (FS4) αυξάνει κατά δύο κατάλοιπα από το (FS2)→(FS3) ξεκινά μια κοινή πορεία σύνθεσης των δύο αυτών παραγώγων. Αρχικά

συντέθηκε η αλληλουχία Fmoc-SFY-pNA (A) η οποία χωρίστηκε στα δύο: (A<sub>1</sub>) για συνέχιση και παραγωγή του (FS2) υποστρώματος και (A<sub>2</sub>) για συνέχιση και παραγωγή του (FS3) υποστρώματος.

#### ✚ Σύνθεση της αλληλουχίας Fmoc-SFY-pNA (A)

##### • Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Y(tButyl)-pNA

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 3.0 g Fmoc-Y(tButyl)-pNA (5.18 mmoles), διαλύονται σε 45 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (208 mmoles, 22 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.751 g (4.9 mmoles) 94.6%**

##### • Ενεργοποίηση του Fmoc-F-OH και Σύζευξη με το H-Y(tButyl)-pNA

Σε σφαιρική φιάλη 200 ml ζυγίζονται 1.809 g Fmoc-F-OH (4.67 mmoles) διαλύονται σε 25 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους -17°C για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.48 ml N-μεθυλομορφολίνης (4.76 mmoles) και 0.90 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (4.90 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους -17°C.

Ακολουθεί προσθήκη 1.751 g H-Y(tButyl)-pNA (4.90 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 40 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των -17°C για 1 ώρα, έπειτα στους 0°C για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη.

Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με H<sub>2</sub>O. Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - άνυδρου διαιθυλαιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 3.067 g (4.22 mmoles) 90.4%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 3.067 g Fmoc-FY(tButyl)-pNA (4.22 mmoles), διαλύονται σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (169 mmoles, ~18ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.97g (3.90 mmoles) 92.4%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-S(tButyl)-OH και Σύζευξη με το H-Y(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 200 ml ζυγίζονται 1.42 g Fmoc-S(tButyl)-OH (3.714 mmoles) διαλύονται σε 25 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους -17°C για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.38 ml N-μεθυλομορφολίνης (3.79 mmoles) και 0.72 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (3.90 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους -17°C. Ακολουθεί προσθήκη 1.97g H-FY(tButyl)-pNA (3.90 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 35 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των -17°C για 1 ώρα, έπειτα στους 0°C για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση

συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με H<sub>2</sub>O. Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - άνυδρου διαιθυλαιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 2.96g (3.4 mmoles) 91.5%**

Η αλληλουχία Fmoc-SFY-pNA (A) χωρίζεται ως εξής: (A<sub>1</sub>)-0.96g για συνέχιση και παραγωγή του (FS2) υποστρώματος και στην (A<sub>2</sub>)-2g για συνέχιση και παραγωγή του (FS3) υποστρώματος.

 **Σύνθεση του υποστρώματος Abz-SFY-pNA (FS2) ξεκινώντας από την αλληλουχία (A<sub>1</sub>)**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.96 g Fmoc-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.1 mmoles), διαλύονται σε 15 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (44 mmoles, ~4.7ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.648 g (1.00 mmole) 90.9%**

• **Ενεργοποίηση του Fmoc-2-aminobenzoic acid και Σύζευξη με το H-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.341 g Fmoc-2-aminobenzoic acid (0.95 mmol) διαλύονται σε 10 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.10 ml N-μεθυλομορφολίνης (0.97 mmol) και 0.19 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (1.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί προσθήκη 0.648g H-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.00 mmol), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.83 g (0.84 mmol) 88.4%**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Abz-S(tBu)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 50 ml ζυγίζονται 0.83 g Fmoc-Abz-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (0.84 mmol), διαλύονται σε 15 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (33.6 mmol, ~3.5 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και

εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.582 g (0.76 mmoles) 90.4%**

• **Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και παραγωγή του Abz-SFY-pNA (FS2)**

Σε σφαιρική φιάλη 50 ml τοποθετείται όλη η ποσότητα του Abz-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (0.582 g -0.76 mmoles), προστίθενται 10 ml διαλύματος αποκοπής (9.3 ml TFA, 0.4 ml TIS, 0.1 ml H<sub>2</sub>O, 0.05 g φαινόλη) και η αντίδραση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~180 min, αναδεύοντας κατά διαστήματα.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί εξάτμιση (flash evaporator), προσθήκη διαιθυλαιθέρα και ξανά εξάτμιση (flash evaporator). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για δύο φορές ακόμα. Τέλος, Το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη διαιθυλαιθέρα σε παγόλουτρο, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.425 g (0.65 mmoles) 85.5%, Ολική απόδοση: 59.01%**

✚ **Σύνθεση του υποστρώματος Abz-GNFY-pNA (FS3) ξεκινώντας από την αλληλουχία (A<sub>2</sub>)**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-S(tBu)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 2.00 g Fmoc-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (2.3 mmoles), διαλύονται σε 25 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (92 mmoles, ~9.7 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από

μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.36 g (2.1 mmole) 91.3%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-N(Trt)-OH και Σύζευξη με το H-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 1.19 g Fmoc-N(Trt)-OH (2.00 mmoles) διαλύονται σε 20 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.20 ml N-μεθυλομορφολίνης (2.04 mmoles) και 0.39 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (2.10 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί προσθήκη 1.36g H-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (2.10 mmole), που είναι διαλυμένη σε 25 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη.

Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 2.15 g (1.75 mmoles) 87.5%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N $\alpha$  Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-N(Trt)-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 2.15 g Fmoc-N(Trt)-S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.75 mmoles), διαλύονται σε 40ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (70 mmoles,  $\sim 7.4$  ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για  $\sim 120$ min, αφού



διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.608 g (1.6 mmoles) 91.5%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-G-OH και Σύζευξη με το H-N(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.45 g Fmoc-G-OH (1.52 mmoles) διαλύονται σε 20 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.15 ml N-μεθυλομορφολίνης (1.55 mmoles) και 0.3 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (1.6 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί προσθήκη 1.608 g H-N(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.6 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 25 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7.0 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.78 g (1.37 mmoles) 90.2%**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.78 g Fmoc-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.37 mmol), διαλύονται σε 30 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (54.8 mmol, ~5.8 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.48 g (1.25 mmol) 91.5%**

• **Ενεργοποίηση του Fmoc-2-aminobenzoic acid και Σύζευξη με το H-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.427g Fmoc-2-aminobenzoic acid (1.19 mmol) διαλύονται σε 20 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους -17°C για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.115 ml N-μεθυλομορφολίνης (1.214 mmol) και 0.23 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (1.25mmol) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους -17°C. Ακολουθεί προσθήκη 1.48g H-GN(Trt)S(tBu)FY(tButyl)-pNA (1.25 mmol), που είναι διαλυμένη σε 30 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των -17°C για 1 ώρα, έπειτα στους 0°C για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με

H<sub>2</sub>O. Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.52 g (1.07 mmoles) 89.78%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Abz-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.52 g Fmoc-Abz-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.07 mmoles), διαλύονται σε 35 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (42.8 mmoles, ~4.6 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.15 g (0.97 mmoles) 90.7%**

**• Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και παραγωγή του Abz-GNSFY-pNA (FS4)**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml τοποθετείται όλη η ποσότητα του Abz-GN(Trt)S(tButyl)FY(tButyl)-pNA (1.15 g - 0.97 mmoles), προστίθενται 20 ml διαλύματος αποκοπής (18.6 ml TFA, 0.8 ml TIS, 0.2 ml H<sub>2</sub>O, 0.1 g φαινόλη) και η αντίδραση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~180min, αναδεύοντας κατά διαστήματα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί εξάτμιση (flash evaporator), προσθήκη διαιθυλαιθέρα και ξανά εξάτμιση (flash evaporator). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για δύο

φορές ακόμα. Τέλος, Το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη διαιθυλαιθέρα σε παγόλουτρο, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 0.69 g (0.838 mmoles) 86.44%**

**Ολική απόδοση: 48.11%**

### **2B.3.4 Σύνθεση του υποστρώματος Abz-GFI-pNA(FS4)**

#### **• Ενεργοποίηση του Fmoc-F-OH και Σύζευξη με το H-I-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 1.46 g Fmoc-F-OH (3.79 mmoles) διαλύονται σε 20 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.39 ml N-μεθυλομορφολίνης (3.87 mmoles) και 0.73 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (3.98 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί προσθήκη 1g H-I-pNA (3.98 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη.

Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - άνυδρου διαιθυλαιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 2.15 g (3.46 mmoles) 91.3%**

#### **• Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-FI-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 2.15 g Fmoc-FI-pNA (3.46 mmoles), διαλύονται σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (138 mmoles, ~14.6ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με

χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.26 g (3.15 mmoles) 91.04%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-G-OH και Σύζευξη με το H-FI-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.892 g Fmoc-G-OH (3 mmoles) διαλύονται σε 10 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.31 ml N-μεθυλομορφολίνης (3.06 mmoles) και 0.58 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (3.15 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους  $-17^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί προσθήκη 1.26g H-FI-pNA (3.15 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των  $-17^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, έπειτα στους  $0^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator).

Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.86 g (2.75 mmoles) 91.67%**

**• Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-GFI-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 1.86 g Fmoc-GFI-pNA (2.75 mmoles), διαλύονται σε 25 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (110

mmoles, ~11.6 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.15 g (2.51mmoles) 91.3%**

**• Ενεργοποίηση του Fmoc-2-aminobenzoic acid και Σύζευξη με το H-GFI-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται 0.86 g Fmoc-2-aminobenzoic acid (2.39 mmoles) διαλύονται σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου και το διάλυμα ψύχεται στους -17°C για 10 min, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 0.245 ml N-μεθυλομορφολίνης (2.44 mmoles) και 0.46 ml χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα (2.51 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους -17°C. Ακολουθεί προσθήκη 1.15g H-GFI-pNA (2.51 mmoles), που είναι διαλυμένη σε 15 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου. Το μίγμα παραμένει στη θερμοκρασία των -17°C για 1 ώρα, έπειτα στους 0°C για 1 ώρα, ενώ η τιμή pH ρυθμίζεται στο 7 με άνυδρη τριαιθυλαμίνη.

Η αντίδραση συνεχίζεται για μία, ακόμη, ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, απόρριψη του ιζήματος και συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται διαδοχικά με διαλύματα 1 M ανθρακικό νάτριο και 1 M όξινο θειικό νάτριο και τέλος με H<sub>2</sub>O. Η οργανική φάση αφού ξηρανθεί με προσθήκη στερεού άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (flash evaporator), το υπόλειμμα καταβυθίζεται από μίγμα άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα - πετρελαϊκού, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.72 g (2.16 mmoles) 90.4%**

• **Απομάκρυνση της Fmoc-N<sub>α</sub> Προστατευτικής Ομάδας από Fmoc-Abz-GFI-pNA**

Σε σφαιρική φιάλη 150 ml ζυγίζονται 1.72 g Fmoc-Abz-GFI-pNA (2.16 mmoles), διαλύονται σε 15 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου (DCM) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Στο μίγμα προστίθενται 40 ισοδύναμα διαιθυλαμίνης (86.4 mmoles, ~9.1 ml) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ~120 min, αφού διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με χρήση διαλύματος νινυδρίνης ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator), αναδιάλυση του υπολείμματος σε ακετονιτρίλιο (ACN) και εκχύλιση με εξάνιο (3x) και συμπύκνωση μέχρι ξηρού (flash evaporator). Το προϊόν καταβυθίζεται από μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθέρα, διηθείται και τοποθετείται σε ξηραντήρα κενού.

**Απόδοση: 1.12 g (1.95mmoles) 90.3%, Ολική απόδοση: 51.45%**

## **2B.4 Φθορισμομετρικά παράγωγα ως υποστρώματα της MPR**

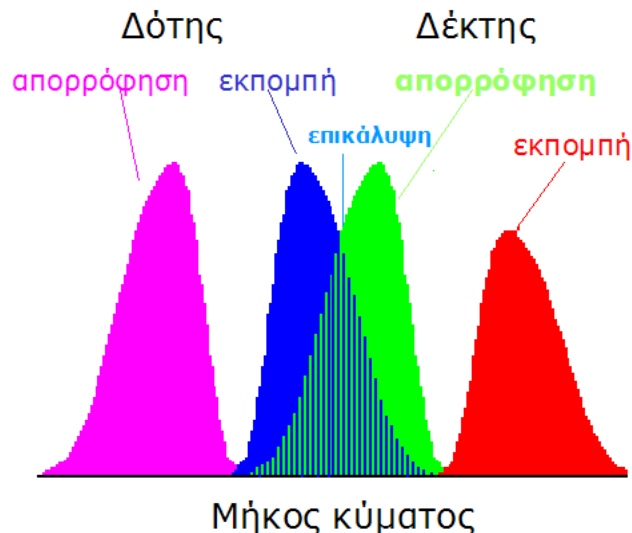
### **2B.4.1 Εισαγωγή-Αρχή της μεθόδου**

Η μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster (Förster Resonance Energy Transfer, **FRET**), είναι ένα φωτοφυσικό φαινόμενο, που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Förster<sup>195</sup>. Κατά την διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας από ένα φθορισμοφόρο με διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση (δότης) σε ένα κοντινό δεύτερο φθορισμοφόρο (δέκτης), χωρίς όμως εκπομπή ακτινοβολίας (φωτονίου). Για να εξηγηθεί η μεταφορά ενέργειας, το διεγερμένο φθορισμοφόρο θεωρείται ως ένα δίπολο που ταλαντώνεται και μεταφέρει ενέργεια σε ένα δεύτερο δίπολο με παρόμοια συχνότητα συντονισμού. Κατά το FRET, η ένταση φθορισμού του δότη μειώνεται, καθώς και ο χρόνος παραμονής στην διεγερμένη κατάσταση και αντίστοιχα η ένταση φθορισμού του δέκτη αυξάνεται.

Η ενέργεια του διεγερμένου φθορισμοφόρου- δότη μεταφέρεται στον δέκτη μόνο εάν τα δύο μόρια βρίσκονται σε κοντινή απόσταση για να αλληλεπιδράσουν (σε ένα εύρος 10-100 Å) και η απόδοση της μεταφοράς είναι άκρως αποτελεσματική, αν ο δότης και ο δέκτης είναι τοποθετημένοι

εντός της ακτίνας Forster (η απόσταση κατά την οποία το ήμισυ της ενέργειας διέγερσης του δότη μεταφέρεται στο δέκτη, τυπικά 3-6 nm)<sup>196,197</sup>.

Οι κατάλληλοι δότης και δέκτης ανιχνευτές επιλέγονται με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά απορρόφησης και εκπομπής τους. Για τη βέλτιστη μεταφορά ενέργειας συντονισμού το φάσμα εκπομπής του δότη πρέπει να αλληλεπικαλύπτεται σημαντικά (> 30 %) με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη (**Εικόνα 2.1**).



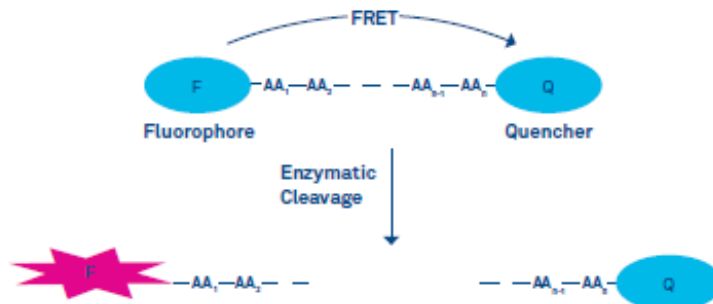
**Εικόνα 2.1.** Φάσματα απορρόφησης (κόκκινο) και φάσματα εκπομπής (μπλε) ζεύγους φθορισμοφόρων δότη-δέκτη. Η γκρι περιοχή δηλώνει την επικάλυψη του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη.

Δηλαδή, το φάσμα του δέκτη είναι μετατοπισμένο ως προς το φάσμα του δότη προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (μικρότερη ενέργεια). Το φαινόμενο μπορεί να γίνει αντιληπτό διεγείροντας με φως μήκους κύματος που αντιστοιχεί στο φάσμα απορρόφησης του δότη και παρατηρώντας εκπομπή φωτός μήκους κύματος που αντιστοιχεί στο φάσμα εκπομπής του δέκτη.

Ένα μεγάλο εύρος τεχνικών προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων στηρίζονται σε μετρήσεις μέσω μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET). Ειδικότερα, για την μέτρηση της δραστικότητας πρωτεολυτικών ενζύμων χρησιμοποιούνται FRET πεπτιδικά υποστρωμάτα, όπου μεταξύ του φθορισμοφόρου- δότη και του φθορισμοφόρου-δέκτη παρεμβάλεται μια μικρή πεπτιδική αλληλουχία εντός της οποίας βρίσκεται η θέση διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού. Το πρώτο μέλος του ζεύγους FRET λειτουργεί ως δότης ενέργειας και το δεύτερο μέλος της συνάρτησης ζεύγους



FRET ως δέκτη ενέργειας. Έτσι, η πρωτεολυτική διάσπαση του πεπτιδίου έχει ως αποτέλεσμα το φθορισμό αφού το φθορισμοφόρο- δότης διαχωρίζεται από το φθορισμοφόρο-δέκτη (Σχήμα 2.8).



**Σχήμα 2.8:** Πρωτεολυτική διάσπαση πεπτιδίου και εκπομπή φθορισμού μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster

Έτσι, η μέθοδος αυτή μπορεί να πιστοποιήσει εάν τα νεοσυντιθέμενα FRET παράγωγα συνιστούν υποστρώματα της MPR και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της πρωτεολυτικής της δραστηρότητας, διότι μόνο εφόσον συμβεί πρωτεολυτική διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, εκπέμπεται ακτινοβολία από τον δέκτη, η οποία ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά.

## 2B.4.2 Έλεγχος υδρόλυσης των FRET παραγώγων από την MPR

Για να διαπιστωθεί εάν τα νεοσυντιθέμενα FRET παράγωγα συνιστούν υποστρώματα της MPR πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRET (Wavelength scan- Emission) σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού Hitachi F-2500 FL. Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν φάσματα εκπομπής φθορισμού σε ένα εύρος  $\lambda_{em} = 340 - 500 \text{ nm}$ , ενώ το μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{ex}$ ) ορίστηκε στα 340 nm. Είναι γνωστό ότι η υδρόλυση FRET υποστρωμάτων με ζεύγος φθορισμοφόρων Abz/pNA μπορεί να ανιχνευτεί στα 415 nm με μήκος κύματος διέγερσης  $\lambda_{ex}=340 \text{ nm}$ <sup>198</sup>.

Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξεικών ιονικής ισχύος 0.1 M και τιμής pH 3.7, σε σταθερή θερμοκρασία 37°C.

Χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της MPR, με τίτλο  $[E]_0 = 500\text{nM}$  και τα τέσσερα FRET παράγωγα σε συγκέντρωση  $10\ \mu\text{M}$  σε διαλύματα DMSO και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 940  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος, 40  $\mu\text{l}$  DMSO, 10  $\mu\text{l}$  ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10  $\mu\text{l}$  διαλύματος του κάθε παραγώγου σε DMSO και λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα εκπομπής σε ένα εύρος  $\lambda_{em} = 340 - 500\ \text{nm}$ .

Για να διαπιστωθεί εάν όντως η ένδειξη φθορισμού με μέγιστο  $\lambda_{em} = 415\ \text{nm}$  οφείλεται αποκλειστικά στην υδρόλυση του κάθε παραγώγου από την MPR ελήφθησαν φάσματα φθορισμού ελέγχου: (i) απουσία της MPR, (ii) απουσία της MPR και απουσία των FRET παραγώγων και (iii) απουσία των (i) και (ii), καθώς και του προστιθέμενου DMSO.

## **2B.5 Προσδιορισμός των παραμέτρων Michaelis-Menten της MPR με τα νεοσυντιθέμενα φθορισμομετρικά υποστρώματα σε $\theta = 35^\circ\text{C}$ και τιμή $\text{pH} = 3.70$**

Από τα φάσματα εκπομπής που ελήφθησαν σε ένα εύρος  $\lambda_{em} = 340 - 500\ \text{nm}$  και για τα τέσσερα FRET παράγωγα διαπιστώθηκε ότι τα τρία από αυτά συνιστούν υποστρώματα της MPR και συγκεκριμένα παρουσιάζουν  $\lambda_{em}$  στα 415 nm.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μετρήσεις με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων σε διάφορες συγκεντρώσεις του κάθε υποστρώματος για τον υπολογισμό των παραμέτρων Michaelis-Menten της MPR κατά την υδρόλυση των υποστρωμάτων αυτών. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις του εκάστοτε υποστρώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξεικών ιονικής ισχύος 0.1 M και τιμής  $\text{pH} 3.7$ , σε σταθερή θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  και μετρήθηκε η μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 340\ \text{nm}$ ) για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης (120 sec). Χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της MPR, με τίτλο  $[E]_0 = 500\ \text{nM}$  και συγκεντρώσεις υποστρώματος: (i) 0.85 - 41  $\mu\text{M}$  για το Abz-GFY -pNA, (ii) 5.5 - 81.5  $\mu\text{M}$  για το Abz-SFY -pNA και (iii) 5.5 - 139  $\mu\text{M}$  για το Abz-GFI-pNA σε διαλύματα DMSO.

Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ( $[S]_i$ ,  $v_i$ ) προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Michaelis-Menten (εξ ορισμού  $V_{max} = k_{cat}[E_0]$ ), υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$ , ενώ η προσαρμογή της έγινε με τη χρήση του προγράμματος **Origin**<sup>178</sup>. Σε όλες τις προσαρμογές, ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη.

## 2B.6 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $1/K_m$ της MPR, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $pK_a$

Μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $1/K_m$  ως συνάρτηση της τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, της ρεννίνης χρησιμοποιώντας το συνθετικό FRET-πεπτιδικό υπόστρωμα **Abz-GFY-pNA**.

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C και βασίστηκαν στη μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα της MPR, με τίτλο  $[E]_0 = 500$  nM και το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA, σε συγκεντρώσεις (i)  $[S] \ll K_m = 0.8$   $\mu$ M και (ii)  $[S] \gg K_m = 40$   $\mu$ M, σε διαλύματα DMSO. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων ιονικής ισχύος 0.1 M με τιμές pH από 2.00 έως 7.50. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 2A.3 και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 940  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος, 40  $\mu$ l DMSO, 10  $\mu$ l ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10  $\mu$ l διαλύματος υποστρώματος Abz-GFY-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της έντασης του φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου ( $\Delta F/\text{min}$ ). Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ( $[S]_i$ ,  $v_i$ ) προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίστηκαν οι παράμετροι,  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$ , και  $1/K_m$ . Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του

προγράμματος Origin<sup>178</sup>. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη.

## 2B.7 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ της MPR ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της ενζυμικής υδρόλυσης

Μελετήθηκε η μεταβολή των κινητικών παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$ , σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας κατά την υδρόλυση των υποστρωμάτων Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA από την MPR. Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων σε μια σειρά θερμοκρασιών που κυμαίνονταν από 15°C έως 60°C, που αυξάνονταν κατά 5°C και που βασίστηκαν στην μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση των τριών υποστρωμάτων. Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της MPR, με τίτλο  $[E]_0 = 500$  nM και τα υποστρώματα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, σε συγκεντρώσεις (i)  $[S] \ll K_m$  και (ii)  $[S] \gg K_m$  σε διαλύματα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξεικών ιονικής ισχύος 0.1 M, τιμής pH = 4.5. Η διαδικασία των κινητικών μετρήσεων ήταν η ίδια όπως αυτή που έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω, στην Ενότητα 2B.6, με τη διαφορά ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά διαφορετικών θερμοκρασιών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα θερμικής σταθερότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία της μέγιστης δραστηριότητας για να διαπιστωθεί εάν η μείωση της δραστηριότητας οφείλεται σε μετουσίωση του ενζύμου.

Ακολούθως, όλες οι σταθερές ταχύτητας, καθώς και οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι ενεργοποίησης  $\Delta S^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta G^\ddagger$  υπολογίστηκαν με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μορφές της γενικής εξίσωσης Arrhenius (εξισώσεις 1.7α - 1.9), καθώς και σε μία μορφή της εξίσωσης Eyring

(εξίσωση 1.10), αντίστοιχα και σχεδιάστηκε το ενεργειακό διάγραμμα της αντίδρασης.

## 2B.8 Μέτρηση της μεταβολής των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}$ της MPR σε διάφορα μίγματα $H_2O/D_2O$

Μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  της MPR σε μίγματα  $H_2O/D_2O$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού  $n$ ), χρησιμοποιώντας το συνθετικό FRET πεπτιδικό υπόστρωμα Abz-GFY-pNA. Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξεικών 0.1 M, σε μίγματα  $H_2O/D_2O$  διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο και παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 2A.5.2. Συνολικά παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα οξεικών με ατομικά κλάσματα δευτερίου  $n = \{0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 0.99\}$ .

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία και βασίστηκαν στη μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA. Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της MPR, με τίτλο  $[E]_0 = 250$  nM και το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA σε συγκεντρώσεις (i)  $[S] \ll K_m = 0.8$   $\mu$ M και (ii)  $[S] \gg K_m = 40$   $\mu$ M, σε διαλύματα DMSO σε πέντε διαφορετικές τιμές ατομικού κλάσματος δευτερίου  $n$  του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης.

Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ( $[S]_i$ ,  $v_i$ ) προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$ . Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος Origin<sup>178</sup>. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη.

## 2B.9 Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή

### 2B.9.1 Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή

Αντικείμενο της μελέτης αυτής ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων πεπτιδικών υποστρωμάτων με υψηλή εξειδίκευση (η μεγαλύτερη δυνατή  $k_{cat}/K_m$ , δηλ. μεγάλη  $k_{cat}$  και μικρή  $K_m$ ), που να διαθέτουν τέτοια χαρακτηριστικά ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και στατιστικά ισχυρής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν (ενότητα 3B.5), το υπόστρωμα που πληρεί τα χαρακτηριστικά αυτά είναι το Abz-GFY-rNA και για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της MPR ακολουθήθηκε η πορεία που περιγράφεται στην συνέχεια και βασίζεται στην μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ ) κατά την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού.

Σε θερμοστατούμενη κυψελίδα (35°C) φασματοφθορισμομέτρου 1 mL, προστίθενται διαδοχικά 940  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος οξεικών ιονικής ισχύος 0.1 M και τιμής pH 4.35, 40  $\mu\text{L}$  DMSO, 10  $\mu\text{L}$  ενζυμικού παρασκευάσματος (αρχικό διάλυμα 25  $\mu\text{M}$ ) και τέλος 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος του υποστρώματος σε DMSO έτσι ώστε η συγκέντρωσή του μέσα στην κυψελίδα να ισούται προς την τιμή της  $K_m$  ( $[S] = 8.016\text{E-}3 \text{ mM}$ ) και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ ) για το πρώτο λεπτό της αντίδρασης. Για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με χρήση σειράς διαλυμάτων της πρότυπης φθορίζουσας χημικής ένωσης Abz-G, η οποία απελευθερώνεται στο διάλυμα κατά την υδρόλυση του υποστρώματος από την MPR, όμοια κατεργασμένων. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τον ίδιο τρόπο έχουν υπολογιστεί όλες οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων που χρησιμοποιήθηκαν στις κινητικές μετρήσεις της παρούσας διατριβής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης φθορισμού και της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

### 2B.9.2.α Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή

Όπως αναφέρθηκε, οι ασπαρτικοπρωτεΐνάσες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς *Rhizomucor miehei* και *Rhizomucor pusillus* έχουν χαρακτηριστεί ως πολλά υποσχόμενα υποκατάστατα της βοοειδούς χυμοσίνης. Για την ευρεία χρήση των ενζύμων αυτών στην παραγωγή τυριού σε βιομηχανική κλίμακα, είναι απαραίτητη η ακινητοποίηση τους και η ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού της δραστηριότητας τους. Έτσι, με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που επέδειξε το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA και στην μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στην ενότητα 2B.9.1 για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή (διάλυμα) αναπτύχθηκε μία μεθοδολογία για την μέτρηση της δραστηριότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα παρασκευάσματα της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή -ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες- οι οποίοι παρασκευάστηκαν με σκοπό την χρήσή τους για παραγωγή τυριού και είναι ευγενική προσφορά του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πατρών - Τμήμα Χημείας. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν:

#### **Βιοκαταλύτης 1: MPR ακινητοποιημένη σε σωληνωτή κυτταρίνη (TC-MPR)**

Υδατικό διάλυμα MPR (0.4g/5ml) προστέθηκε στάγδην και με συνεχή ανάδευση σε 10 g σωληνωτής κυτταρίνης (TC). Ακολούθησε θερμική ξήρανση στους 37°C για 24h.

#### **Βιοκαταλύτης 2: MPR ακινητοποιημένη σε σύνθετο υλικό σωληνωτής κυτταρίνης/πηκτής αμύλου –τρόπος ακινητοποίησης A (TC/SG-MPR)**

10 g σωληνωτής κυτταρίνης (TC) προστέθηκαν σε πηκτική αμύλου (4 g) και το σύνθετο υλικό τοποθετήθηκε σε θερμοθάλαμο για θερμική ξήρανση στους 37°C για 48h. Ακόλουθη η προσθήκη στάγδην και με συνεχή ανάδευση υδατικού διαλύματος MPR (0.4g/5ml) και θερμική ξήρανση στους 37°C για 24h.

**🚩 Βιοκαταλύτης 3: MPR ακινητοποιημένη σε σύνθετο υλικό σωληνωτής κυτταρίνης/πηκτής αμύλου –τρόπος ακινητοποίησης Β (TC-SG/MPR)**

Υδατικό διάλυμα MPR (0.4g/5ml) προστέθηκε στάγδην και με συνεχή ανάδευση στην πηκτική αμύλου κι εν συνεχεία προστέθηκαν 10 g σωληνωτής κυτταρίνης (TC). Ακολούθησε θερμική ξήρανση στους στους 37°C για 48h.

**🚩 Βιοκαταλύτης 4: MPR ακινητοποιημένη σε σύνθετο υλικό σωληνωτής κυτταρίνης/πηκτής αμύλου –τρόπος ακινητοποίησης Γ (TC/Rennin-SG/MPR)**

Υδατικά διαλύματα MPR (0.4g/5ml) χρησιμοποιήθηκαν σε δύο ισόποσα μέρη. Το ένα μέρος ( $1/2$ ) προστέθηκε σε πηκτική αμύλου (30°C) υπό ανάδευση. Το υπόλοιπο διάλυμα MPR προστέθηκε στάγδην σε 10 g σωληνωτής κυτταρίνης (TC). Στη συνέχεια, ενωποιήθηκαν τα μίγματα σωληνωτής κυτταρίνης/MPR και πηκτής αμύλου/MPR και τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο για θερμική ξήρανση στους 37°C για 48h.

Όλοι οι βιοκαταλύτες τοποθετήθηκαν σε διάτρητο νάυλον ύφασμα.

Η δραστικότητα παρασκευασμάτων ακινητοποιημένης MPR προσδιορίστηκε με χρήση του FRET-υποστρώματος Abz-GFY-pNA και εφαρμόστηκε στους συντεθέντες Βιοκαταλύτες 1 ως 4. Οι προσδιορισμοί δραστικότητας της ακινητοποιημένης MPR, με την μορφή των Βιοκαταλυτών, έγινε ως εξής:

(α) Σε θερμοστατούμενο υάλινο φιαλίδιο (35°C), εφοδιασμένο με μαγνητικό αναδευτήρα και υπό συνεχή ανάδευση, προστίθενται διαδοχικά 9400  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος οξεικών ιονικής ισχύος 0.1 M και τιμής pH 4.35, 400  $\mu$ L DMSO, 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη (αιωρούμενου) και 100  $\mu$ L διαλύματος του υποστρώματος σε DMSO (αρχή χρόνου) έτσι ώστε η συγκέντρωσή του εντός του φιαλιδίου να ισούται προς την τιμή της  $K_m$  σε διάλυμα ( $[S] = 8.016E-3$  mM).

(β) Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 1 λεπτό με αφαίρεση του βιοκαταλύτη, ενώ 1 mL του διαλύματος της αντίδρασης μεταφέρεται σε κυψελίδα φασματοφθορισμομέτρου και καταγράφεται η ένταση του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm).



(γ) Για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με χρήση σειράς διαλυμάτων της πρότυπης φθορίζουσας χημικής ένωσης Abz-G, η οποία απελευθερώνεται στο διάλυμα κατά την υδρόλυση του υποστρώματος από την MPR, όμοια κατεργασμένων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης φθορισμού και της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

### **2B.9.2.β Έλεγχος λειτουργικής σταθερότητας των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις: συσχέτιση της προσδιοριζόμενης δραστηριότητας της MPR και της ικανότητας πήξης γάλακτος**

Η λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών μελετήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων. Αρχικά προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του κάθε βιοκαταλύτη σύμφωνα με την μέθοδο που προτάθηκε στην ενότητα 2B.9.2.β και εν συνεχεία προσδιορίστηκε η ικανότητα πήξης του γάλακτος.

Σε ποτήρι ζέσεως του 1L το οποίο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C, προστέθηκαν 400 ml γάλακτος και 0.04 g CaCl<sub>2</sub>. Στην συνέχεια προστέθηκε ο εκάστοτε βιοκαταλύτης (B1-B4) στον οποίο είχαν ακινητοποιηθεί 0.4g MPR και καταγράφηκε ο χρόνος πήξης του γάλακτος. Ο βιοκαταλύτης είχε τοποθετηθεί σε διάτρητο νάυλον ύφασμα κι είχε προσαρμοστεί κατάλληλα στο ποτήρι ζέσεως. Αφού έλαβε χώρα η πήξη του γάλακτος ο βιοκαταλύτης αφαιρέθηκε προσεκτικά, ξεπλύθηκε με φρέσκο γάλα και μετρήθηκε η δραστηριότητά του. Τέλος, τοποθετήθηκε σε καινούρια ποσότητα γάλακτος ίδιου όγκου και σύστασης και καταγράφηκε ο χρόνος πήξης του γάλακτος. Πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις για τον κάθε βιοκαταλύτη.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

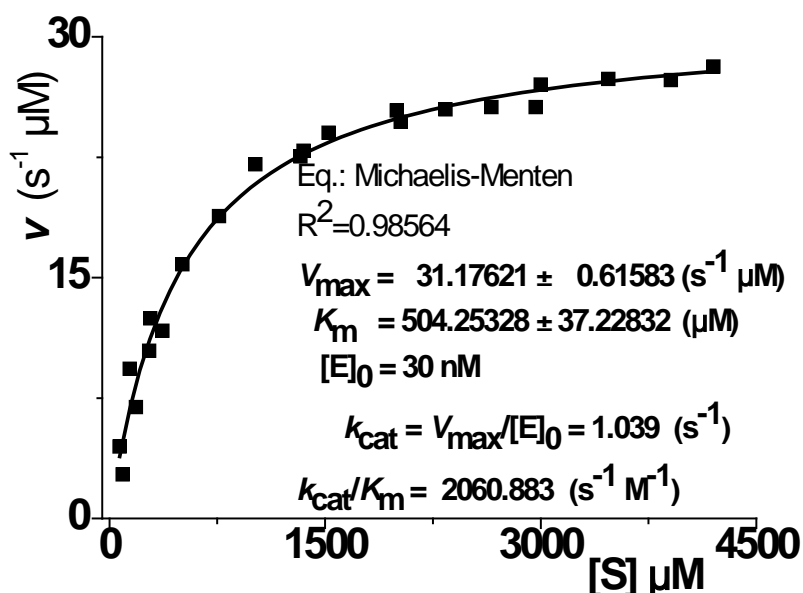
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ



### 3Α. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ ΕΛΑΣΤΑΣΗΣ ΧΟΙΡΟΥ (PPE)

#### 3Α.1 Κινητική της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου

Με βάση τις πειραματικές τιμές των αρχικών ταχυτήτων της αντίδρασης της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου επί του υποστρώματος Suc-AAA-pNA, σε  $\theta = 25^{\circ}\text{C}$  και τιμή  $\text{pH} = 8.00$  του μέσου της αντίδρασης, προσαρμόστηκε η εξίσωση Michaelis-Menten (**Διάγραμμα 3.1**) και υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ,  $k_{\text{cat}}$  και  $K_{\text{m}}$ . Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον ένθετο πίνακα του Διαγράμματος 3.1.

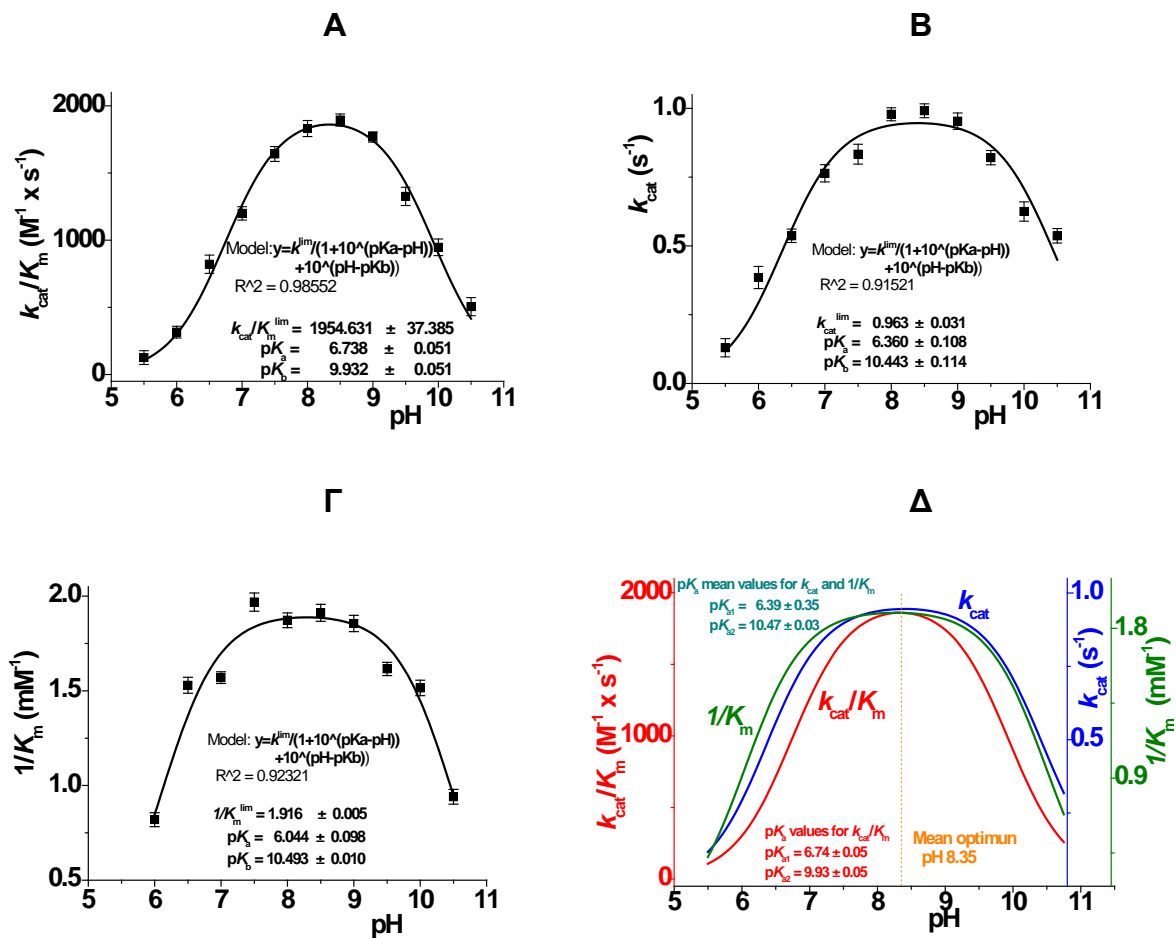


**Διάγραμμα 3.1:** Καμπύλη Michaelis-Menten της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με το υπόστρωμα Suc-AAA-pNa. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{\text{max}}$ ,  $K_{\text{m}}$ ,  $k_{\text{cat}}$  και  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ .

#### 3Α.2 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ , $k_{\text{cat}}$ και $1/K_{\text{m}}$ της PPE, ως συνάρτηση της τιμής $\text{pH}$ του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $\text{pK}_a$

Στην Ενότητα 2Α.3 μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ,  $k_{\text{cat}}$  και  $1/K_{\text{m}}$  της υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από τη σερινοπρωτεάση PPE. Στη συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα των

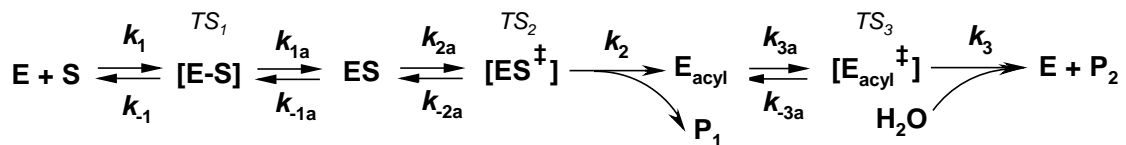
εξαρτήσεων ( $k_{cat}/K_m$ )=f(pH), ( $k_{cat}$ )=f(pH) και ( $1/K_m$ )=f(pH) προσαρμόστηκαν με τις εξισώσεις (1.12 - 1.14), με τη χρήση του προγράμματος Origin και προσδιορίστηκαν οι αντίστοιχες τιμές  $pK_a$ . Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής (η εξίσωση 1.12 προσάρμοσε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα) για την PPE παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.2Α-Δ** και στα αντίστοιχα ένθετα.



**Διάγραμμα 3.2:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **Α.** ( $k_{cat}/K_m$ )=f(pH), **Β.** ( $k_{cat}$ )=f(pH) και **Γ.** ( $1/K_m$ )=f(pH) για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA από την PPE. Το Διάγραμμα **Δ** αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των **Α-Γ**.

Η ύπαρξη σταθεροποιημένων καταστάσεων των αντιδρώντων που διέπονται είτε από την σταθερά  $k_{cat}$  είτε και από την  $1/K_m$  επιβεβαιώνεται από

τις καμπύλες των διαγραμμάτων, των παραπάνω παραμέτρων, ως προς την τιμή pH, οι οποίες βρέθηκαν να είναι ευρύτερες από εκείνη που αντιστοιχεί στην παράμετρο  $k_{cat}/K_m$ . Αν και στις τρεις περιπτώσεις προσδιορίστηκαν δύο τιμές  $pK_a$ , μία στην όξινη περιοχή των τιμών pH και μία στην αλκαλική, ωστόσο οι τιμές αυτών είναι παρόμοιες μόνο στην περίπτωση των παραμέτρων  $k_{cat}$  και  $1/K_m$ , ενώ διαφέρουν αισθητά στην περίπτωση της  $k_{cat}/K_m$  (**Διάγραμμα 3.2Α-Γ**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κυρίαρχα ενζυμικά είδη είναι το ακυλο-ένζυμο ( $E_{acyl}$ ) στο οποίο αντιστοιχούν οι εκτιμώμενες τιμές  $pK_a$ , καθώς διαπιστώθηκε ότι  $k_2 \gg k_3$  (**Σχήμα 3.1**).



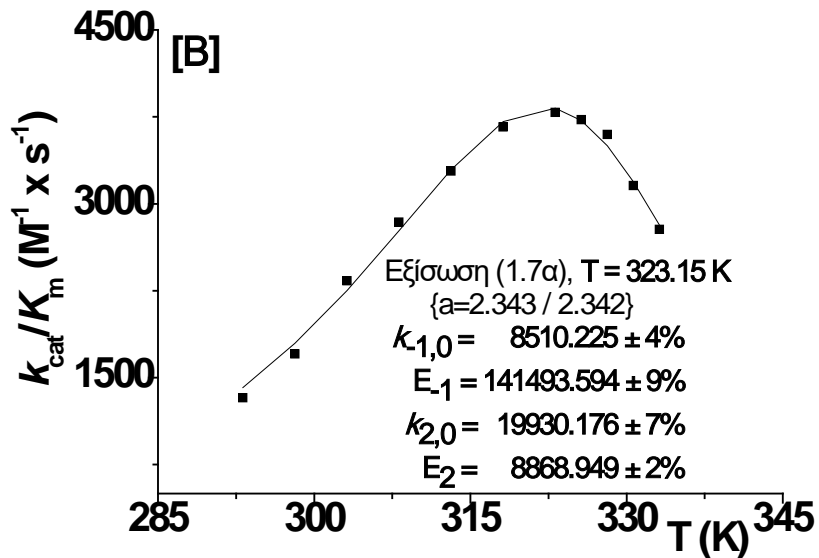
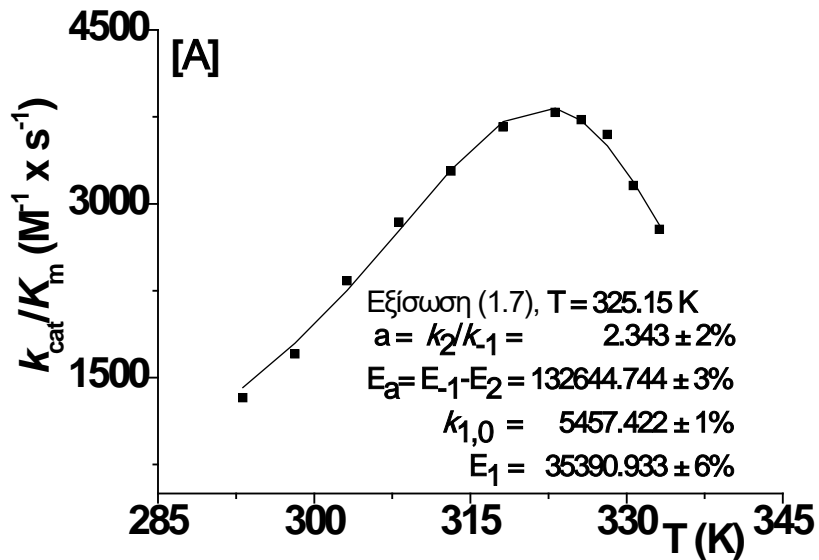
**Σχήμα 3.1:** Πιθανό σχήμα αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNA, από την PPE

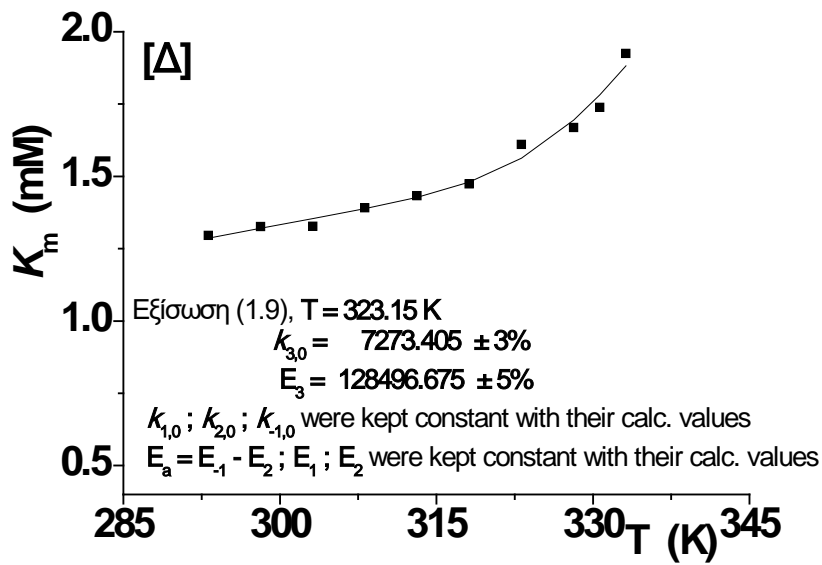
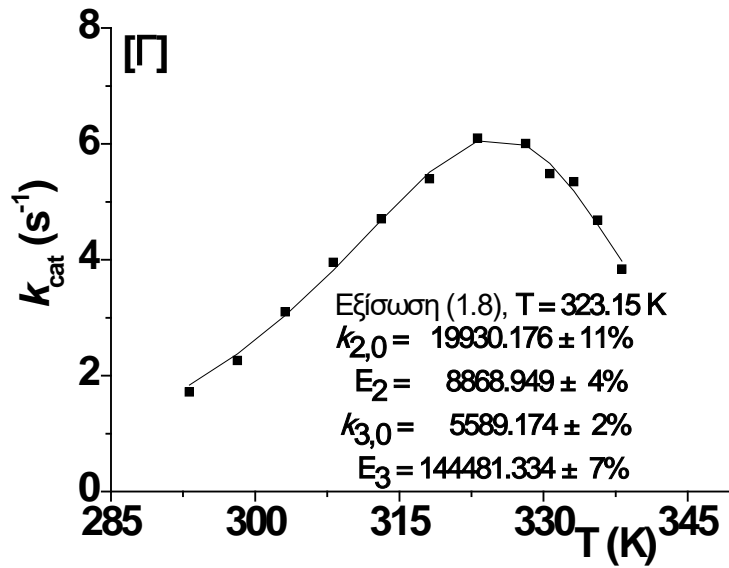
Οι προαναφερθείσες καταστάσεις αντίδρασης (reactant states) ακολουθούν τους ιονισμούς του ελεύθερου ενζύμου E και του υποστρώματος S, είτε προς την κατεύθυνση των προϊόντων (παράμετρος  $k_{cat}/K_m$ ), είτε προς το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES (παράμετρος  $1/K_m$ ), ενώ για την παράμετρος  $k_{cat}$  ακολουθείται ο ιονισμός του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος ES προς την κατεύθυνση των προϊόντων. Κατά συνέπεια, είναι πιθανό ότι υπάρχουν περισσότερα ενδιάμεσα ενζυμικά είδη σύμφωνα με το Σχήμα 3.1. Ιονισμός του υποστρώματος δεν υπάρχει στην περίπτωση αυτή αφού η ομάδα Suc- του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε, με  $pK_a = 4.19$ , φαίνεται καθαρά ότι δεν συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση<sup>175,183,184,199</sup>.

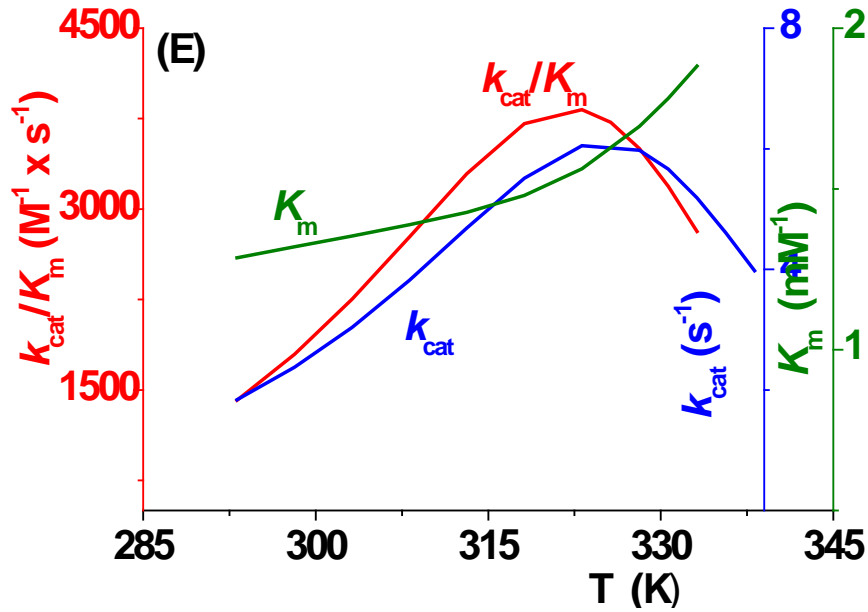
### 3A.3 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της PPE ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της αντίδρασης

Στην ενότητα 2A.4 μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$  με την απόλυτη θερμοκρασία για την αντίδραση της PPE με το συνθετικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA. Τα πειραματικά δεδομένα

$(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ,  $(k_{cat})=f(T)$  και  $(K_m)=f(T)$  που προέκυψαν προσαρμόστηκαν με τις εξισώσεις (1.7 - 1.9). Τα αποτελέσματα της προσαρμογής, καθώς και οι μορφές των εξισώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση, παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.3Α-Ε** (στα ένθετα αναφέρονται οι υπολογισθείσες τιμές σημαντικών παραμέτρων).



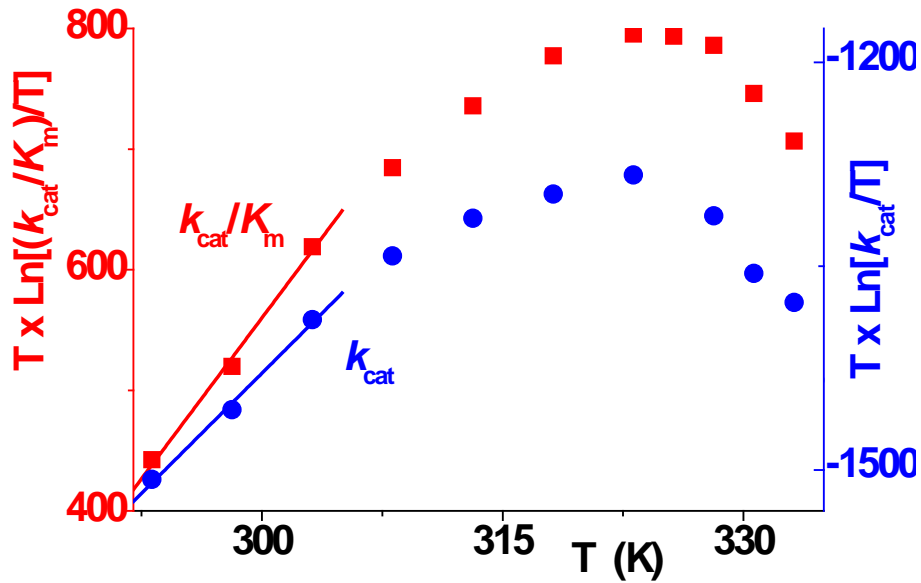




**Διάγραμμα 3.3:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A** και **B**  $[(k_{cat}/K_m)=f(T)]$ , **Γ**  $[(k_{cat})=f(T)]$ , **Δ**  $[(K_m)=f(T)]$  για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNa από την PPE. Το Διάγραμμα **E** αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των **A**, **B**, **Γ** και **Δ**.

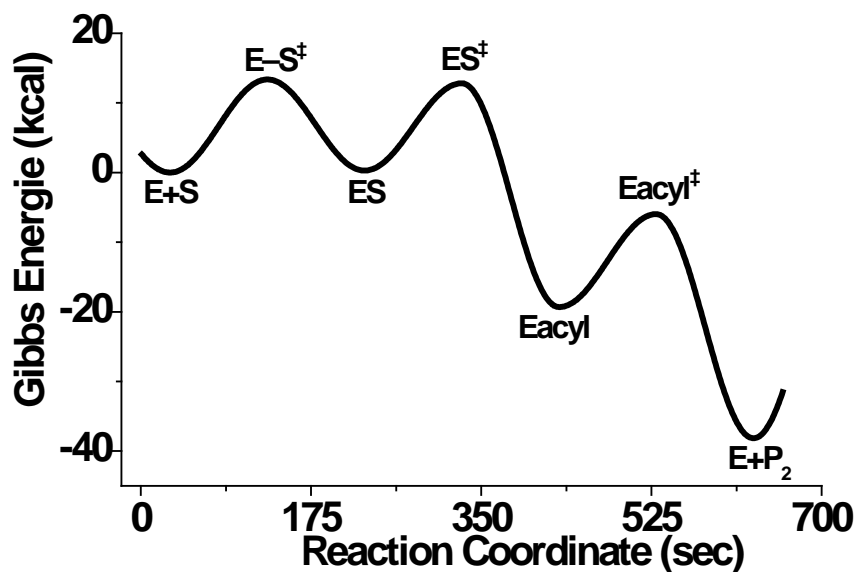
Κάτω από αυτές τις συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (1.10), η οποία στηρίζεται στη σχέση μεταξύ της αλλαγής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs και των αλλαγών στην *ενθαλπία* και την *εντροπία*, για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων  $(k_{cat}/K_m)=f(T)$  και  $(k_{cat})=f(T)$  και για τον υπολογισμό των αντίστοιχων θερμοδυναμικών παραμέτρων (**Διάγραμμα 3.4**)





**Διάγραμμα 3.4:** Εξάρτηση των (α)  $k_{cat}/K_m$  και (β)  $k_{cat}$  από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και παραγωγή θερμοδυναμικών δεδομένων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις.

Από την παραπάνω διαδικασία, δηλαδή τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διαγραμμάτων 3.3 Α-Δ και 3.4 κατασκευάστηκε το ενεργειακό διάγραμμα της αντίδρασης (**Διάγραμμα 3.5**) σύμφωνα με το **Σχήμα 3.1**.



**Διάγραμμα 3.5:** Ενεργειακό διάγραμμα των επιμέρους σταδίων των αντιδράσεων υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNa από την PPE.

Στο προηγούμενο διάγραμμα, οι ενεργειακές διαφορές είναι εμφανείς. Οι καμπύλες σχεδιάστηκαν με χρήση των υπολογισθέντων τιμών των σταθερών ταχύτητας  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  και  $k_3$ , που βρέθηκαν για το ένζυμο αυτό από τα Διαγράμματα εξάρτησης των  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  ως προς την απόλυτη θερμοκρασία και με την υπόθεση ότι η τιμή του προ-εκθετικού παράγοντα Arrhenius ισούται προς  $6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  για όλα τα στάδια.

Έτσι, προκύπτουν νεωτεριστικά και ενδιαφέροντα στοιχεία τα οποία συνοψίζονται στα εξής: (α) το Σχήμα (3.1) της αντίδρασης επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα της απόλυτης θερμοκρασίας, (β) βρέθηκε μια πλήρης συμφωνία του συνολικού φαινομένου με τις υπολογιζόμενες τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  και  $\Delta G^\ddagger$  στις περιπτώσεις των  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$ , όπου τονίζονται τα εντροπικά φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με τον σχηματισμό των συμπλόκων ES και  $E_{acyl}$ , αντίστοιχα ( $\Delta S_{k_{cat}/K_m}^\ddagger - \Delta S_{k_{cat}}^\ddagger = 49.839 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

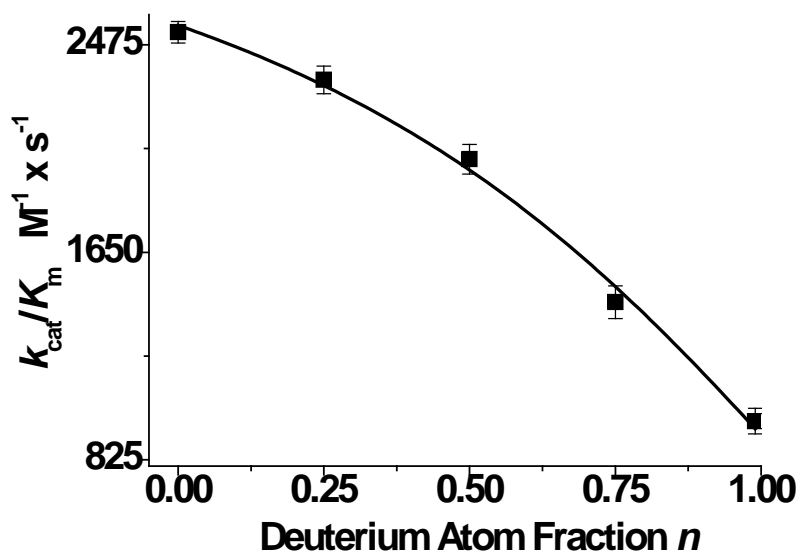
Το διάγραμμα της εξάρτησης της  $k_{cat}$  ως προς την απόλυτη θερμοκρασία, βρέθηκε να έχει ελαφρά μετατοπιστεί προς υψηλότερες θερμοκρασίες επιβεβαιώνοντας ότι οι πορείες που σχετίζονται με την απομάκρυνση του υποστρώματος από το ένζυμο υπερισχύουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπου ισχύει η σχέση  $k_{cat}/K_m \neq k_1$ , και άρα ισχύει ότι  $k_{cat}/K_m = k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)$ , δηλαδή η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  είναι σύνθετη και αναφέρεται σε όλα τα στάδια από την αρχή της ενζυμικής αντίδρασης ως την ακυλίωση του ενζύμου. Ωστόσο και παρά το γεγονός ότι, επίσης, ισχύει η σχέση  $k_2 \gg k_3$  ( $k_2/k_3 \approx 3.57$ ) φαίνεται ότι είναι πιθανό να ισχύει και η σχέση  $k_{cat} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$ , δηλαδή η παράμετρος  $k_{cat}$  είναι σύνθετη και αναφέρεται σε όλα τα στάδια από το ES ως την απακυλίωση του ενζύμου και τον σχηματισμό του  $P_2$ <sup>176</sup>.

Εξ' άλλου πορείες με χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης, όπως η διάχυση του υποστρώματος στην ενεργό περιοχή του ενζύμου (αρχή της ενζυμικής αντίδρασης ή ακυλίωση), υπερισχύουν σε χαμηλές θερμοκρασίες ( $\theta < 25^\circ\text{C}$ ) όπου ισχύει  $k_2 \gg k_{-1}$  και  $k_{cat}/K_m = k_1$ . Όμως, η απομάκρυνση του υποστρώματος έχει μια υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης και υπερισχύει σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό δίνει στο διάγραμμα  $T \times \ln[(k_{cat}/K_m)/T] = f(T)$  ένα

διακριτό μέγιστο, επειδή η κλίση αλλάζει από θετική (σε χαμηλές θερμοκρασίες) σε αρνητική (σε υψηλές θερμοκρασίες).

### 3Α.4 Η εξάρτηση της παραμέτρου $k_{cat}/K_m$ της PPE ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης

Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge (GBK)-**εξίσωση 2.1** προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα ( $n$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) που προέκυψαν από τις κινητικές μετρήσεις της PPE ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης. Η διαδικασία της προσαρμογής πραγματοποιήθηκε σταδιακά<sup>176,199</sup>. Ειδικά για την περίπτωση της υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNa, από την PPE, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (2.10), η οποία εκφράζει και το γεγονός της λειτουργίας μιας φαινομενικής μεταβατικής κατάστασης (virtual transition state - ενότητα 2Α.5.1). Στο **Διάγραμμα 3.6** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη προσαρμογή του βέλτιστου μοντέλου της εξίσωσης **GBK** (εξίσωση 2.10) στα δεδομένα για το υπόστρωμα Suc-AAA-pNa. Οι παράμετροι των εξισώσεων **GBK** υπολογίστηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης < 95%.



**Διάγραμμα 3.6:** Γραφική παραστάση της συνάρτησης  $(k_{cat}/K_m) = f(n)$ , για την υδρόλυση του υποστρώματος **Suc-AAA-pNa** από την PPE..

Στο προηγούμενο διάγραμμα οι καταμετρήσεις πρωτονίων για την  $k_{cat}/K_m$  βρέθηκε: (α) ότι δείχνουν ένα μεσαίο ισοτοπικό φαινόμενο, (β) υπολογίστικαν οι τιμές των παρακάτω παραμέτρων:  $(k_{cat}/K_m)_0 = 2525.99 \pm 15.71 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $C_{Ph} = 0.30 \pm 0.01$ ,  $C_{Ch} = 0.70 \pm 0.02$ ,  $\phi^{T,Ch} = 0.37 \pm 0.01$  και Ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη (S.I.E.) = 2.64 και (δ) από προκαταρκτικά πειράματα είχαν υπολογιστεί οι τιμές  $Z_1 = 2.00$  and  $\mu = 2.00$  (**εξίσωση 2.10**).

Τα αποτελέσματα έδωσαν καμπύλες με τα κοίλα προς τα κάτω (bowed upward) καθώς εκφράζεται ένα ενδιάμεσο ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη. Οι υπολογισθείσες τιμές των  $C_{Ph}$ ,  $C_{Ch}$ ,  $\phi^{T,Ch}$  και  $\mu$  συνηγορούν για την ύπαρξη μιας εικονικής μεταβατικής κατάστασης κατά την διάρκεια της αντίδρασης όπου κυριαρχεί η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  και όπου γίνονται αποδεκτά δύο ανταγωνιστικά στάδια: ένα φυσικό στάδιο με μικρότερη συμμετοχή ( $C_{Ph} = 0.30$ ) κι ένα χημικό ( $C_{Ch} = 0.70$ ). Και τα δύο προαναφερθέντα στάδια συνεισφέρουν στον σχηματισμό ενός μη-ομοιοπολικού συμπλόκου ( $ES^\ddagger$ ) και στην επαγόμενη παραγωγή του προϊόντος  $P_1$  (αμινο-υπόλοιπο). Στην συνέχεια ακολουθούν δύο στάδια, δηλαδή ο σχηματισμός του ακυλ-ενζύμου ( $E_{acyl}$ ) και του προϊόντος  $P_2$  (οξύ-υπολοίπου). Τα προηγούμενα ευρύματα, σε συμφωνία με εκείνα από τα διαγράμματα των εξαρτήσεων των παραμέτρων Michaelis-Menten από την τιμή pH του διαλύματος της αντίδρασης, επιβεβαιώνουν το **Σχήμα 3.1** και υποστηρίζουν τα ως τώρα αποτελέσματα.

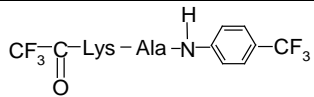
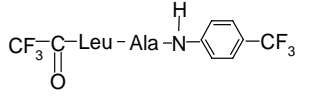
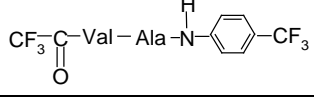
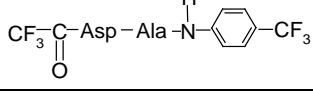
Έχει αναφερθεί ότι διαμορφωτικές αλλαγές του συμπλόκου ES σχετίζονται κατ' ευθείαν με τις αποτελεσματικές αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος με την ενεργό περιοχή της PPE στην μεταβατική κατάσταση προς την ακυλίωση. Επιπλέον δύο πρωτόνια ( $\mu=2$ ) από διαφορετικές πρωτονιακές περιοχές μεταφέρονται στην μεταβατική κατάσταση του χημικού σταδίου, όπου η τιμή του παράγοντα κλασμάτωσης  $\phi^{T,Ch}$  υπολογίστηκε 0.37 και μαζί με το παρατηρούμενο ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη (S.I.E.) θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί, πιο πιθανά, σε υδρογονικές γέφυρες μεταβατικών καταστάσεων κατά την διάρκεια της κατάλυσης με την βοήθεια του διαλύτη ( $H_2O/D_2O$ ). Τέτοιες γέφυρες παρατηρούνται κυρίως κατά την μεταφορά πρωτονίων μεταξύ ατόμων οξυγόνου και αζώτου τα οποία συνήθως βρίσκονται σε όλα τα

μοριακά είδη της υπό μελέτη αντίδρασης (Ενζυμο, υπόστρωμα, αναστολείς κ.λ.π. 179,180,199-201).

### 3A.5 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PPE και των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων (ανταγωνιστικών αναστολέων)

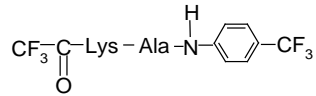
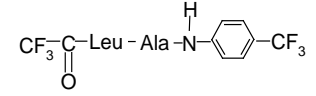
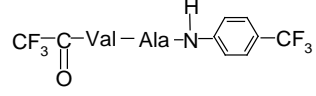
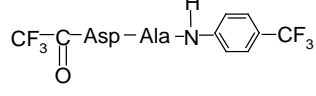
Στην ενότητα 2A.6.1 πραγματοποιήθηκαν υπολογιστικές προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων και του τρόπου πρόσδεσης των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων στην ενεργό περιοχή της PPE. Τελικά, επιλέχθηκαν οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις (καλύτερες πόζες) για το κάθε σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα με βάση την συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity) και την σύναρτηση ενέργειας Glide XP και προσδιορίστηκαν ο αριθμός των σχηματιζόμενων υδρογονοδεσμών με σημαντικά κατάλοιπα-κλειδιά της PPE (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1:** Αποτελέσματα προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης των αναστολέων στην ενεργό περιοχή της PPE (μέθοδος Glide-XP μεγάλης ακρίβειας)

	Αναστολέας	Glide XP Docking Score	Glide XP energy (kJ)	Κατάλοιπα που συμμετέχουν σε HB	HB
<b>1</b>		<b>-7.16</b>	<b>-209.97</b>	<b>V<sup>216</sup>, S<sup>214</sup></b>	<b>4</b>
<b>2</b>		<b>-6.95</b>	<b>-192.30</b>	<b>V<sup>216</sup>, S<sup>214</sup></b>	<b>3</b>
<b>3</b>		<b>-6.55</b>	<b>-186.94</b>	<b>V<sup>216</sup>, S<sup>214</sup></b>	<b>3</b>
<b>4</b>		<b>-6.44</b>	<b>-181.08</b>	<b>Q<sup>192</sup>, S<sup>195</sup>, V<sup>216</sup>, G<sup>193</sup>, T<sup>41</sup></b>	<b>5</b>

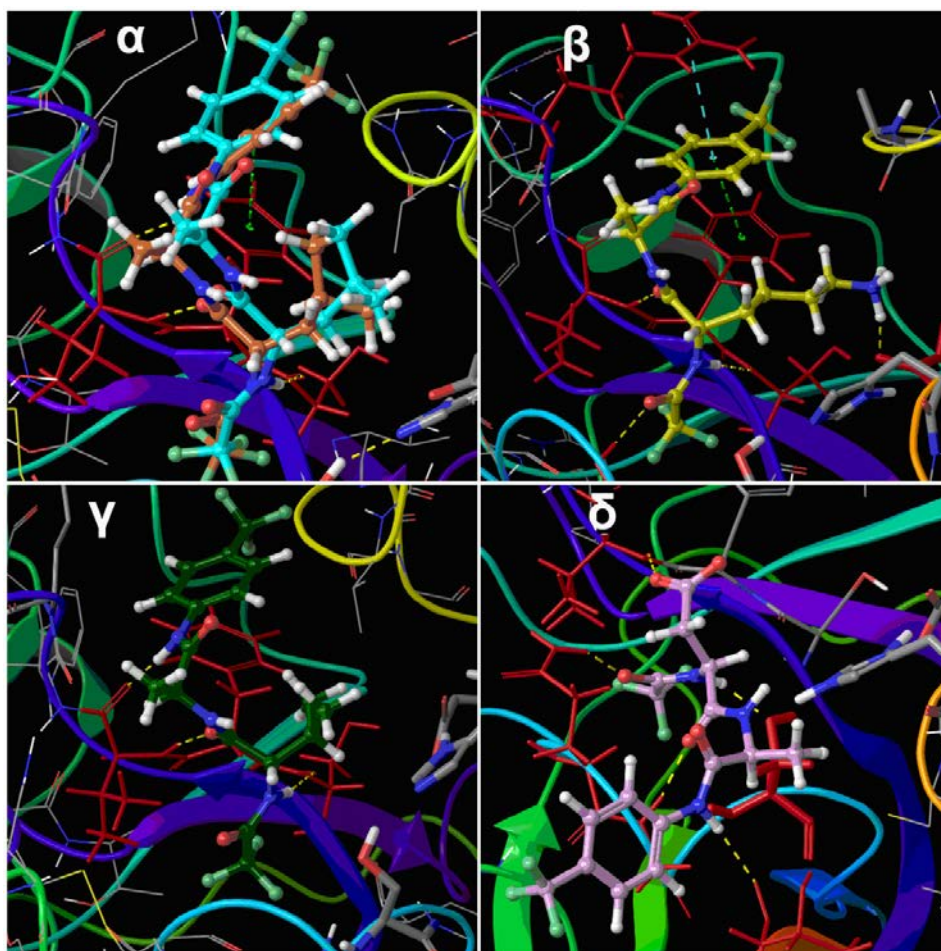
Οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις για κάθε αναστολέα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (χαμηλότερη τιμή XP G-score) επαναβαθμολογήθηκαν με την προσέγγιση MM-GBSA και υπολογίστηκαν οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα με την προσέγγιση MM-GBSA

Αναστολέας	$\Delta G$ Ενέργειας πρόσδεσης	$\Delta G$ Ενέργειας Coulomb	$\Delta G$ Ενέργειας δεσμών H	$\Delta G$ Ενέργειας Λιποφιλίας	$\Delta G$ Ενέργειας van der Waals	$\Delta G$	$\Delta G$
						Ενέργειας αλληλ/ων $\pi-\pi$	Ενέργειας επιδιαλύ/ης GB
1 	<b>-393.22</b>	<b>-117.19</b>	<b>-5.57</b>	<b>-137.49</b>	<b>-199.63</b>	<b>-3.10</b>	<b>69.92</b>
2 	<b>-380.20</b>	<b>-108.27</b>	<b>-3.10</b>	<b>-133.85</b>	<b>-202.43</b>	<b>-1.84</b>	<b>69.29</b>
3 	<b>-344.66</b>	<b>-89.05</b>	<b>-3.14</b>	<b>-117.65</b>	<b>-186.90</b>	<b>-1.47</b>	<b>53.55</b>
4 	<b>-346.63</b>	<b>-239.07</b>	<b>-7.58</b>	<b>-106.72</b>	<b>-186.56</b>	<b>0.00</b>	<b>193.30</b>

\* Εκφρασμένες σε  $\text{in kJ mol}^{-1}$

Όσον αφορά τον τρόπο πρόσδεσης αυτού του είδους των αναστολέων προκύπτει ότι η τριφθορο-ακέτυλο ομάδα (N-τελικό άκρο) προσδένεται-αλληλεπιδρά με την S<sub>1</sub> υποπεριοχή στην PPE, ενώ για το υπόλοιπο τμήμα των μορίων αυτών παρατηρείται μια διαφοροποίηση στον τρόπο πρόσδεσης για τον αναστολέα-4, πιθανά λόγω του αρνητικού φορτίου του καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος (**Εικόνα 3.1α-δ**).



**Εικόνα 3.1:** Στιγμιότυπα του τρόπου πρόσδεσης των αναστολέων 1-4 στην ενεργό περιοχή της PPE (7EST) όπως προέκυψαν από την μέθοδο μεγάλης ακρίβειας πρόσδεσης (Glide XP) όπου φαίνονται: (α) Αλληλεπικάλυψη της προσδεμένης (docked) πόζας (γαλάζιο χρώμα) του αναστολέα-2 με την διαμόρφωση της κρυσταλλικής του δομής (καφέ), (β) αναστολέας-1, (γ) αναστολέας-3, (δ) αναστολέας-4 (κατάταξη στον Πίνακα 3.1).

Τα παράγωγα αυτά προσδένονται στην PPE μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και π-π αλληλεπιδράσεων κυρίως με τα σημαντικά κατάλοιπα S<sup>214</sup>, F<sup>215</sup>, V<sup>216</sup> and R<sup>217A</sup> του ενζύμου. Αξιοσημείωτη είναι η ισχυρή π-π αλληλεπίδραση του αναστολέα-1 (C-τελικό άκρο το οποίο διαθέτει γεωμετρία τύπου sandwich) με την F<sup>215</sup> (-3.31 kJ mol<sup>-1</sup>), η οποία συνεισφέρει σε υψηλότερη σταθεροποίηση του αναστολέα-1 στην ενεργό περιοχή της PPE σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς. Επίσης, παρατηρείται ένα διαφορετικό δίκτυο δεσμών υδρογόνου κατά την αλληλεπίδραση του αναστολέα-4 με την PPE στο οποίο συμμετέχουν τα κατάλοιπα V<sup>216</sup>, Q<sup>192</sup>, S<sup>195</sup>, G<sup>193</sup> και T<sup>41</sup>.

Οι υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) των συμπλόκων PPE-αναστολέων κυμαίνονται από -344.66 ως -397.41 kJ mol<sup>-1</sup>, με τον αναστολέα-1 να επιδεικνύει την χαμηλότερη τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  (ευνοϊκότερη πρόσδεση). Μεταξύ των ενεργειακών όρων που συνεισφέρουν στην  $\Delta G_{\text{bind}}$ , αξιοσημείωτη είναι ισχυρή  $\Delta G$  της ενέργειας Coulomb για τον αναστολέα-4 η οποία αντισταθμίζεται από την μη ευνοϊκή τιμή της  $\Delta G$  επιδιάλυσης GB-energy, με αποτέλεσμα την υψηλότερη τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$ .

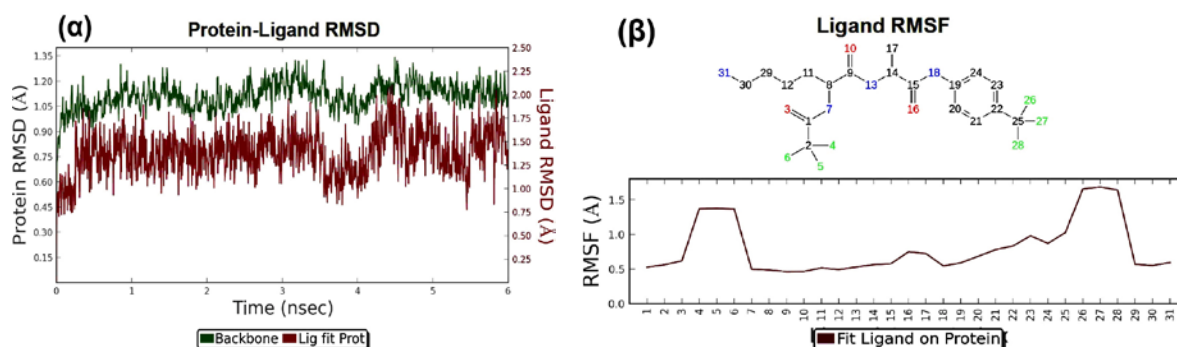
### 3A.6 Έλεγχος σταθερότητας και προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων εντός του συμπλόκου PPE-αναστολέα-1

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής διάρκειας 5 ns στο ενεργειακώς ελαχιστοποιημένο σύμπλοκο PPE-αναστολέα-1 που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο (το σύμπλοκο με την καλύτερη διαφορά ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης), για να ελέγξουμε την σταθερότητα του συμπλόκου αυτού και να προσδιορίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της πρόσδεσης στην ενεργό περιοχή της PPE.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι επέρχεται ισορροπία εντός των πρώτων ns της προσομοίωσης με τις τιμές RMSD τόσο της PPE όσο και του αναστολέα να σταθεροποιούνται σε αποστάσεις μικρότερες των 2 Å, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2α**, υποδεικνύοντας ότι το ένζυμο διατηρεί μια σταθερή διαμόρφωση και ότι ο αναστολέας διατηρεί την αρχική θέση

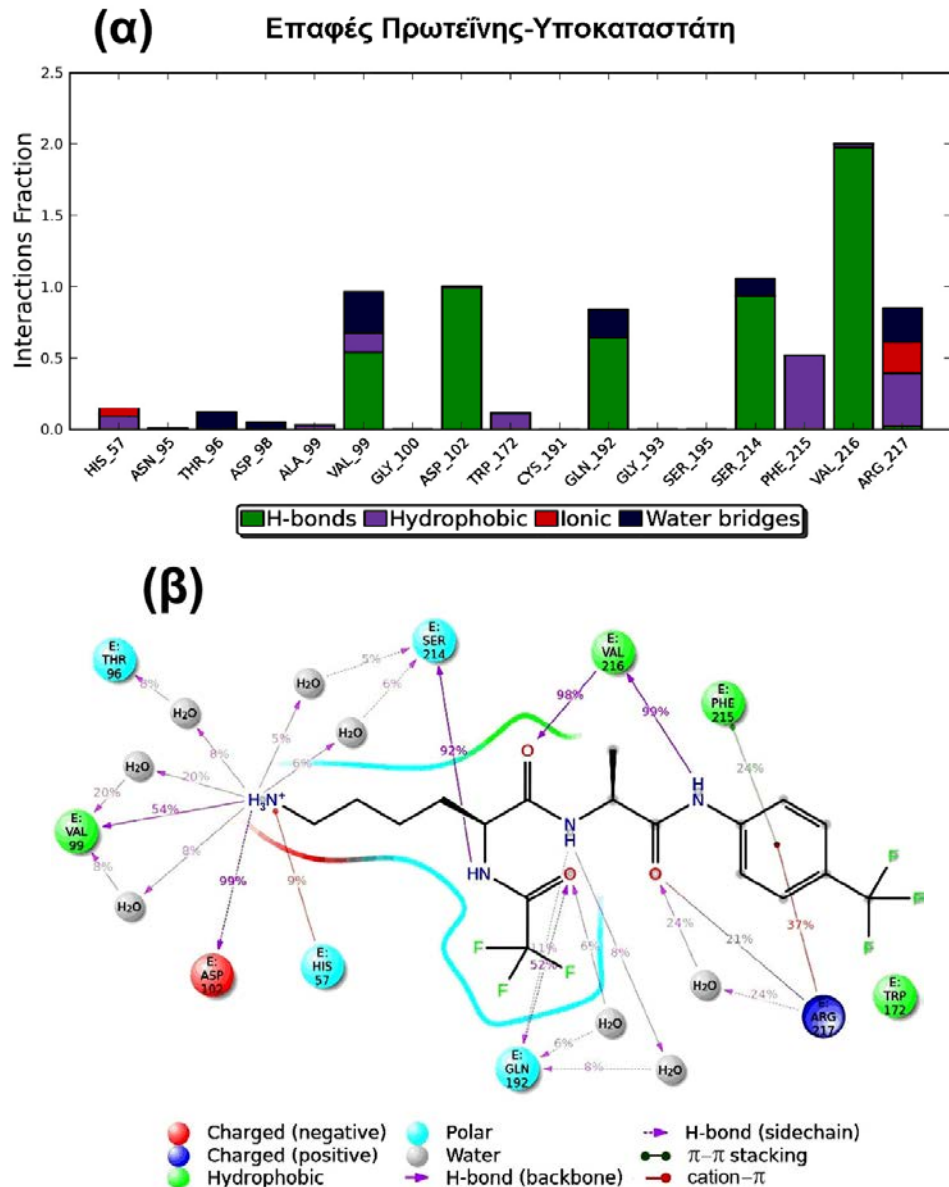


πρόσδεσης του στην PPE. Επίσης, παρατηρούμε ότι οι δύο  $-CF_3$  του αναστολέα (N-τελικό και C-τελικό άκρο) παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις (**Εικόνα 3.2β**) κι έτσι θεωρείται πιο πιθανό να μην συνεισφέρουν στην πρόσδεση του αναστολέα-1.



**Εικόνα 3.2:** (α) Οι τιμές RMSD και των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού της PPE, αλλά και των βαρέων ατόμων του αναστολέα  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ . Η RMSD εξέλιξη της PPE βασίστηκε στα  $\alpha$ -άτομα άνθρακα (αριστερός Y-άξονας), ενώ η τιμή RMSD του αναστολέα βασίστηκε σε όλα τα βαρέα του άτομα (δεξιός Y-άξονας), κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD), (β) Η γραφική παράσταση των διακυμάνσεων της μέσης τετραγωνικής ρίζας των ομάδων του  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$  με αναφορά την PPE.

Στην **Εικόνα 3.3α-β** παρουσιάζονται τα είδη και η διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναστολέα-1 και της PPE.



**Εικόνα 3.3:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ PPE και αναστολέα  $\text{CF}_3\text{C(O)-KA-NHPh-p-CF}_3$  κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD): **(α)** τύποι και % ποσοστά αλληλεπιδράσεων της PPE με σημαντικά κατάλοιπων του αναστολέα, **(β)** λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις PPE-αναστολέα που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης (η ομάδα  $-\text{C}_6\text{H}_4\text{-CF}_3$  του καρβόξυ-τελικού άκρου του αναστολέα  $\text{CF}_3\text{C(O)-KA-NHPh-p-CF}_3$  βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων  $\text{F}^{215}$  και  $\text{R}^{217}$  του πρωτεϊνικού σκελετού της PPE).

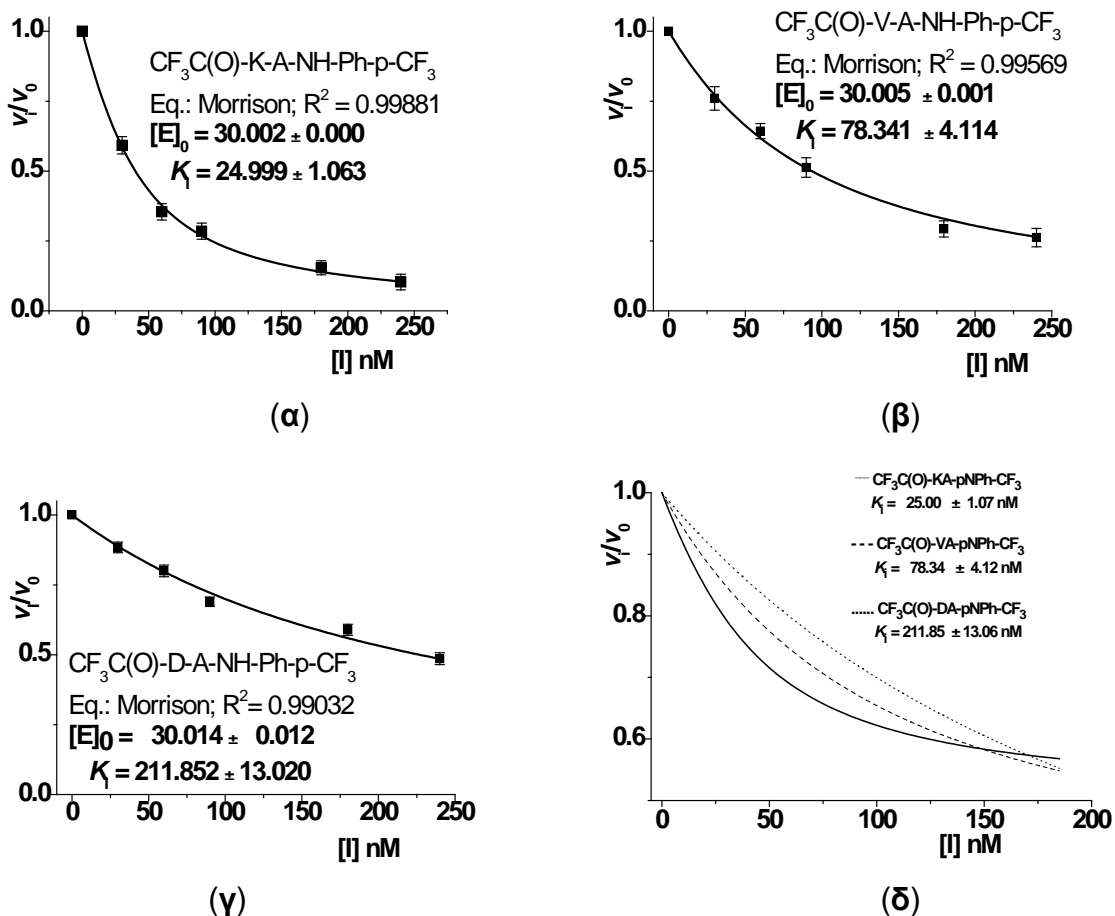
Μεταξύ των τεσσάρων δεσμών υδρογόνου που προσδιορίστηκαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης μόνο οι δύο δεσμοί υδρογόνου με

την  $V^{216}$  διατηρούνται καθόλη την διάρκεια της προσομοίωσης. Ο προβλεπόμενος δεσμός με την  $S^{214}$  διατηρείται στο 80% του χρόνου προσομοίωσης, ενώ παρατηρείται ο σχηματισμός επιπλέον δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα  $D^{102}$  and  $G^{193}$ . Επιπλέον, το μόριο του αναστολέα-1 συμμετέχει σε επαφές με μόρια  $H_2O$  που συμβάλλουν στο σχηματισμό γέφυρων υδρογόνου με τα κατάλοιπα  $R^{217A}$  και  $V^{99}$  της PPE. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μετά τα πρώτα ns της προσομοίωσης παρατηρείται μείωση κατά 60% στην επιφάνεια του αναστολέα που είναι προσβάσιμη σε μόρια  $H_2O$ , ενισχύοντας τον ισχυρό και σταθερό τρόπο πρόσδεσης του αναστολέα-1 στην PPE.

### **3A.7 Κινητική της αναστολής της PPE με τα τριφθοροακετυλοπεπτιδικά ανιλίδια**

#### **3A.7.1 Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας των συμπλόκων PPE-αναστολέων ( $K_i$ )**

Στην ενότητα 2A.7 πραγματοποιήθηκαν κινητικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της συγγένειας πρόσδεσης της σειράς των τριφθοροακετυλοπεπτιδικών παραγώγων στην PPE. Στις πειραματικές τιμές των αρχικών ταχυτήτων της αντίδρασης της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου παρουσία του κάθε αναστολέα ( $[I] = 30, 60, 90, 180, 240$  nM) κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-AAA-pNa ( $\theta = 25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 8.00$ ) προσαρμόστηκε η εξίσωση Morrison (**εξίσωση 2.11**). Οι καμπύλες, οι οποίες προέκυψαν, έστρεφαν τα κοίλα προς τα πάνω, υποδηλώνοντας την ανταγωνιστική και αντιστρεπτή φύση των αναστολέων (**Διαγράμματα 3.7α-δ**).



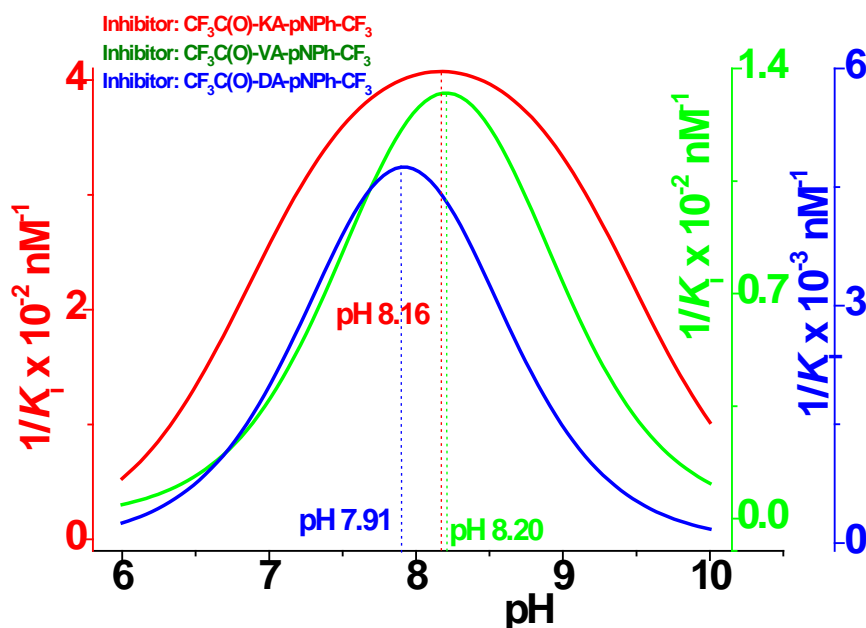
**Διάγραμμα 3.7:** Προσδιορισμός της σταθεράς αστάθειας των συμπλόκων PPE-αναστολέων ( $K_i$ ) με το υπόστρωμα Suc-AAA-pNa: **(α)** για τον αναστολέα  $\text{CF}_3\text{CO-Lys-Ala-NH-Ph-p-CF}_3$ , **(β)** για τον αναστολέα  $\text{CF}_3\text{CO-Val-Ala-NH-Ph-p-CF}_3$ , **(γ)** για τον αναστολέα  $\text{CF}_3\text{CO-Asp-Ala-NH-Ph-p-CF}_3$  και **(δ)** Συγκριτική. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των σταθερών  $K_i$  για κάθε αναστολέα ( $\theta = 25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 8.00$ ).

Όσον αφορά τις  $S_2\text{-P}_2$  αλληλεπιδράσεις, παρατηρείται προτίμηση για θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων (K) σε σχέση με αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα (D), ενώ διατηρείται μεσαία προτίμηση για βραχείες αλειφατικές ομάδες (V).

### 3A.7.2 Εξάρτηση της αναστολής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης: μεταβολή της σταθεράς σχηματισμού του κάθε συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα $K_i (= 1/K_i)$

Μελετήθηκε η μεταβολή της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα  $K_i (= 1/K_i)$  και της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  ως συνάρτηση της τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, της PPE με την σειρά των τριών αντιστρεπτών αναστολέων ( $CF_3CO-Asp-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ ,  $CF_3CO-Lys-Ala-NH-Ph-p-CF_3$  και  $CF_3CO-Val-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ ) χρησιμοποιώντας το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-AAA-pNA.

Αφού προσδιορίστηκε η τιμή  $K_i$  για κάθε σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα σε κάθε τιμή pH του μέσου της αντίδρασης, τα πειραματικά δεδομένα [(pH,  $1/K_i$ )] προσαρμόστηκαν με τις εξισώσεις 1.12, 1.13 και 1.14 και με τη χρήση του προγράμματος Origin και προσδιορίστηκαν οι αντίστοιχες τιμές  $pK_a$ . Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη, ενώ η εξίσωση 1.12 προσάρμοσε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής για την PPE παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3.8**.



**Διάγραμμα 3.8:** Εξάρτηση της σταθεράς σχηματισμού του κάθε συμπλόκου ενζύμου- αναστολέα  $K_i$  ( $=1/K_i$ ) από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων τιμών  $pK_a$  για τους αναστολείς:  **$\text{CF}_3\text{C(O)-KA-NHPh-p-CF}_3$**  (κόκκινο) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.045 \pm 0.002$ ,  $pK_{a1} = 6.872 \pm 0.096$ ,  $pK_{a2} = 9.469 \pm 0.116$ ,  **$\text{CF}_3\text{C(O)-VA-NHPh-p-CF}_3$**  (πράσινο) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.021 \pm 0.011$ ,  $pK_{a1} = 7.666 \pm 0.610$ ,  $pK_{a2} = 8.745 \pm 0.116$  και  **$\text{CF}_3\text{C(O)-DA-NHPh-p-CF}_3$**  (μπλέ) όπου υπολογίστηκαν  $1/K_i = 0.009 \pm 0.002$ ,  $pK_{a1} = 7.509 \pm 0.213$ ,  $pK_{a2} = 8.326 \pm 0.260$ .

Από τις καμπύλες του Διαγράμματος 3.8 της παραμέτρου  $1/K_i$  ως προς την τιμή pH, παρατηρούμε ότι για τους αναστολείς-1 και -3 το μέγιστο είναι μετατοπισμένο προς περισσότερο αλκαλικές τιμές pH, σε σχέση με το μέγιστο που παρατηρείται για τον αναστολέα-4, ενώ προσδιορίστηκαν δύο σχεδόν ίσες τιμές  $pK_a$ , μία στην όξινη περιοχή των τιμών pH και μία στην αλκαλική (για τους αναστολείς 3 και 4). Επιπροσθέτως, παρατηρούμε στενότερες καμπυλότητες για τους αναστολείς-3 και 4 σε σχέση με την μορφή της καμπύλης για τον αναστολέα-1. Πιο στενή μορφή της καμπύλης σε συνδυασμό με την μετατόπιση προς την όξινη περιοχή τιμών pH και τις διαφορές στις υπολογισθείσες τιμές  $pK_a$  (ισορροπία μεταξύ ελεύθερου ενζύμου E και αναστολέα I προς το σύμπλοκο EI) υποδηλώνουν μια σταδιακή

αποσταθεροποίηση του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα (EI) στην περίπτωση των αναστολέων-3 και κυρίως του αναστολέα-4.

### 3A.7.3 Η εξάρτηση της σταθεράς αστάθειας $K_i$ και της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα $K_f$ ( $=1/K_i$ ) ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης

Οι καμπύλες που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων όσον αφορά τις παραμέτρους  $K_i$ ,  $1/K_i$  και  $k_{cat}/K_m$ , παρουσία των τριών αντιστρεπτών αναστολέων ( $CF_3CO-Asp-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ ,  $CF_3CO-Lys-Ala-NH-Ph-p-CF_3$  και  $CF_3CO-Val-Ala-NH-Ph-p-CF_3$ ), βρέθηκαν να στρέφουν τα κοίλα προς τα πάνω (bowed downward), πιο πιθανά λόγω των πολλαπλών δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται στις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ένα υψηλό ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη, το οποίο ήταν και αντίστροφο στην περίπτωση της παραμέτρου  $1/K_i$ . Όλες οι τιμές των παραγόντων κλασμάτωσης και του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη (S.I.E.), καθώς κι άλλων κρίσιμων παραμέτρων υπολογίστηκαν κατά περίπτωση, με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε διάφορα (μορφές) μοντέλα της εξίσωσης **GBK** (Πίνακας 3.3).

Από τον Πίνακα 3.3 εύκολα συμπεραίνεται ότι και για τους τρεις χρησιμοποιηθέντες αναστολείς, οι υπολογιζόμενες τιμές του παράγοντα κλασμάτωσης  $\phi^T$  (καταμετρήσεις πρωτονίων της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$ ), μειώνονται εκθετικά ( $y=y_0+A \cdot e^{-x \cdot \lambda}$ ), δηλαδή μεταβάλλονται ανάλογα προς την μεταβολή της συγκέντρωσης του αναστολέα. Επίσης, οι υπολογιζόμενες τιμές των εκθετών  $\mu$ , της εξίσωσης  $k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$ , καθώς και οι τιμές των αντίστοιχων ισοτοπικών φαινομένων διαλύτη (S.I.E.) προσαρμόστηκαν καλύτερα από την γνωστή εξίσωση Hill  $y = ax^h/(b^h+x^h)$ , συμπεριλαμβανομένης και της εκθετικής της μορφής<sup>202</sup>. Αυτές οι τιμές των συντελεστών Hill για τους εκθέτες  $\mu$  και για τα S.I.E. υπολογίστηκαν με την σειρά τους ως: 0.71, 0.41, 0.11, και 0.46, 0.81, 0.90, για τον αναστολέα-1, τον αναστολέα-3 και τον αναστολέα-4, αντίστοιχα δείχνοντας αυξανόμενη αρνητική συνεργατικότητα για

τους εκθέτες  $\mu$  και μειούμενη αρνητική συνεργατικότητα για το S.I.E. Τα αποτελέσματα αυτά είναι νέα, δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά σε έγκυρο επιστημονικό περιοδικό<sup>203</sup> και δίνουν μια πρόσθετη απόδειξη για την εξέλιξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ PPE και των υποκαταστατών της (ανταγωνιστικοί αναστολείς και υποστρώματα), ως την επίτευξη ισορροπίας.

Η αρνητική συνεργατικότητα αυξάνει για τους εκθέτες  $\mu$  σε συμφωνία με την κατάταξη των χρησιμοποιηθέντων αναστολέων και με βάση τα διάφορα ευρήματα (αλληλεπιδράσεις PPE-αναστολέων, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, τιμές των  $K_i$ ,  $1/K_i$  σε διαγράμματα με την τιμή pH). Ακόμη, η μειωμένη αρνητική συνεργατικότητα αποδίδεται στον καλύτερο αναστολέα, που προσδένεται επάνω στην PPE με σχηματισμό διαμόρφωσης υψηλής συγγένειας και για τα δύο.

Αντίθετα, η παρατηρούμενη μειούμενη αρνητική συνεργατικότητα, στην περίπτωση του S.I.E. βρίσκεται σε κατ' ευθείαν αναλογία προς την μειούμενη αποτελεσματικότητα των τρόπων πρόσδεσης PPE-αναστολέων (με την προαναφερόμενη σειρά), η οποία ευνοεί μια διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας της PPE και με τους δύο υποκαταστάτες της<sup>204</sup>.

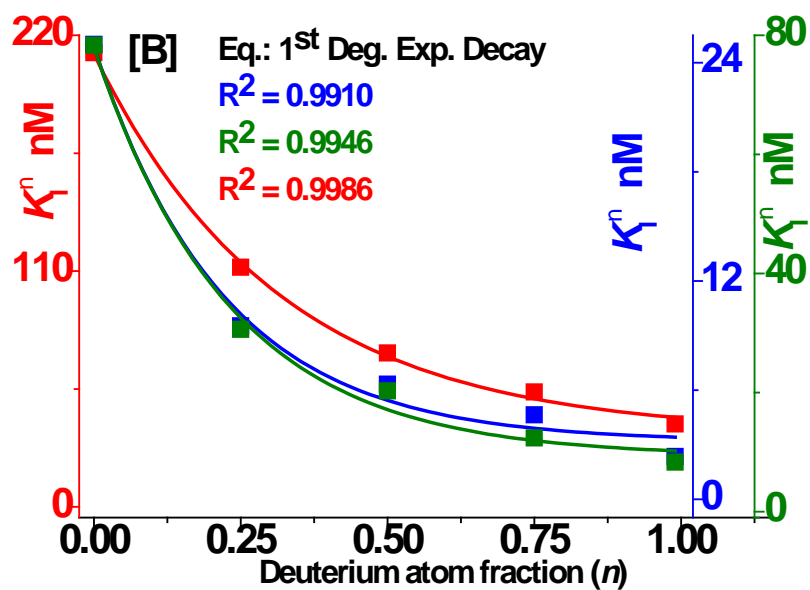
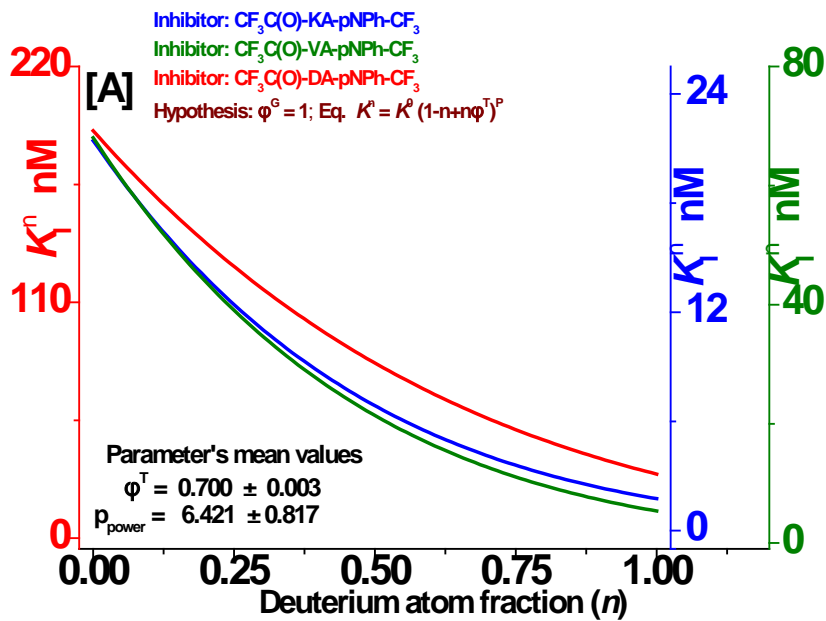
Εξάλλου τέτοια φαινόμενα, σε περιπτώσεις μονομερών ενζύμων βασίζονται σε κινητικές αρχές, αναφέρονται στην έκταση της συνεργατικότητας που επηρεάζει την ισορροπία και την καταλυτική πορεία και προωθούν δομικές αλλαγές στο ενζυμικό μόριο. Τελικά, οι προαναφερόμενες τιμές  $\phi^T$  μαζί με τις υπολογιζόμενες τιμές των εκθετών  $\mu$  και εκείνες των S.I.E. θα πρέπει να αποδοθούν, κυρίως, σε υδρογονικές θέσεις είτε και σε γέφυρες νερού για μεταφορά πρωτονίων στην μεταβατική κατάσταση χωρίς φαινόμενα σύραγγας ή πολύ σπάνια σε δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι είναι πιο ισχυροί στην μεταβατική κατάσταση<sup>205,206</sup>. Οι καταμετρήσεις πρωτονίων για τις παραμέτρους  $K_i$ ,  $1/K_i$  και ανά αναστολέα έδωσαν παρόμοιες τιμές  $\phi^T$  και  $\phi^G$ , που μπορούν να αποδοθούν όπως και προηγουμένως και ισοδύναμα προς εκείνες για την παράμετρο  $k_{cat}/K_m$ . Αυτές οι τελευταίες καταμετρήσεις πρωτονίων μειώνονται γραμμικά από τον αναστολέα 4 κι ως τον αναστολέα 1, ενώ υπολογίστηκαν σχεδόν ίσες τιμές για όλους τους εκθέτες  $\mu$  και  $\nu$  [είτε για την εξίσωση  $k_n=k_0(1-n+n\phi^T)^\mu$  είτε για την εξίσωση  $k_n=k_0/[(1-n+n\phi^G)^\nu]$ ]. Οι τιμές



του S.I.E. ανά αναστολέα υπολογίστηκαν σχεδόν ίσες (δηλαδή το S.I.E. για την  $K_i$ , ισούται προς το  $1/(S.I.E)$  της  $1/K_i$ ) και μειώνονται γραμμικά σύμφωνα με την κατάταξη των αναστολέων (Πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3:** Τιμές των  $\phi$ , S.I.E. και λοιπών παραγόντων από καταμετρήσεις πρωτονίων των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $K_i$  και  $1/K_i$  στην αναστελόμενη υδρόλυση του Suc-AAA-pNA, με PPE (προσαρμογή δεδομένων σε μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge).

	$\phi^T$	$\phi^G$	Εκθέτης $\mu$	S.I.E.	Εξίσωση	[I] nM	Αναστολέας
$k_{cat}/K_m$	0.54		2.03	3.38	$k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$	30	CF <sub>3</sub> C(O)-D A-NHPh-p-CF <sub>3</sub>
	0.52		2.22	4.16		60	
	0.50		2.41	4.87		90	
	0.47		2.50	6.91		180	
	0.46		2.54	7.54		240	
$K_i$	0.54		2.23	3.91	$K_n = K_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$		
$1/K_i$		0.55	2.37	1/4.05	$k_n = k_0/[(1-n+n\phi^G)^\nu]$		
$k_{cat}/K_m$	0.55		2.31	3.95	$k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$	30	CF <sub>3</sub> C(O)-V A-NHPh-p-CF <sub>3</sub>
	0.43		2.61	8.24		60	
	0.40		2.72	11.34		90	
	0.36		2.96	17.12		180	
	0.38		3.09	20.38		240	
$K_i$	0.48		2.27	5.17	$K_n = K_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$		
$1/K_i$		0.49	2.42	1/5.38	$k_n = k_0/[(1-n+n\phi^G)^\nu]$		
$k_{cat}/K_m$	0.61		3.06	4.51	$k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$	30	CF <sub>3</sub> C(O)-K A-NHPh-p-CF <sub>3</sub>
	0.53		3.19	7.63		60	
	0.51		3.28	8.76		90	
	0.44		3.37	14.31		180	
	0.41		3.41	15.15		240	
$K_i$	0.43		2.22	5.98	$K_n = K_0 (1-n+n\phi^T)^\mu$		
$1/K_i$		0.45	2.40	1/6.42	$k_n = k_0/[(1-n+n\phi^G)^\nu]$		



**Διάγραμμα 3.9:** Οι εξαρτήσεις της παραμέτρου  $K_i$ , από το ατομικό κλάσμα δευτερίου ( $n$ ), για τους αντιστρεπτούς αναστολείς  $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-KA-NHPh-p-CF}_3$  (μπλε),  $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-VA-NHPh-p-CF}_3$  (πράσινο) και  $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-DA-NHPh-p-CF}_3$  (κόκκινο): προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση 2.8 [A] και στην φθίνουσα εκθετική εξίσωση [B].

### 3B. Σχεδιασμός και σύνθεση νέων πεπτιδικών υποστρωμάτων για την μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου MPR

#### 3B.1 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων και αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης των FRET-πεπτιδικών παραγώγων στην MPR

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2B.2.1 προχωρήσαμε στο σχεδιασμό φθορισμομετρικών πεπτιδικών παραγώγων (FRET-πεπτιδίων) της γενικής μορφής Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-pNA, Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-pNA και Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>-pNA, που βασίζονται στην μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού κατά Förster. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν υπολογιστικές προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) επιλέγοντας την μέθοδο υψηλής ακριβείας (**extra precision-XP**), του προγράμματος Glide για τον προσδιορισμό της ικανότητας και του τρόπου πρόσδεσης των μορίων αυτών στο ενεργό κέντρο της MPR, με σκοπό την εύρεση των καλύτερων υποψήφιων μορίων-υποστρωμάτων για την MPR.

Τα κριτήρια επιλογής των καλύτερων FRET-πεπτιδικών παραγώγων βασίστηκαν στις τιμές των συναρτήσεων βαθμολόγησης του προγράμματος Glide σε συνδυασμό με τον κατάλληλο προσανατολισμό των παραγώγων αυτών στο ενεργό κέντρο της MPR και την απόσταση μεταξύ του **O** του καταλυτικού μορίου **H<sub>2</sub>O** και του καρβονυλικού άνθρακα του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού (P<sub>1</sub> θέση). Στον **Πίνακα 3.4** παρατίθενται οι τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης των καλύτερων συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων, όπως προέκυψαν από την μέθοδο υψηλής ακριβείας μοριακής πρόσδεσης (**extra precision-XP**), του προγράμματος Glide.

**Πίνακας 3.4:** Τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης (extra precision-docking) των ευνοϊκότερων διαμορφώσεων των FRET-πεπτιδικών παραγώγων στην ενεργό περιοχή της MPR

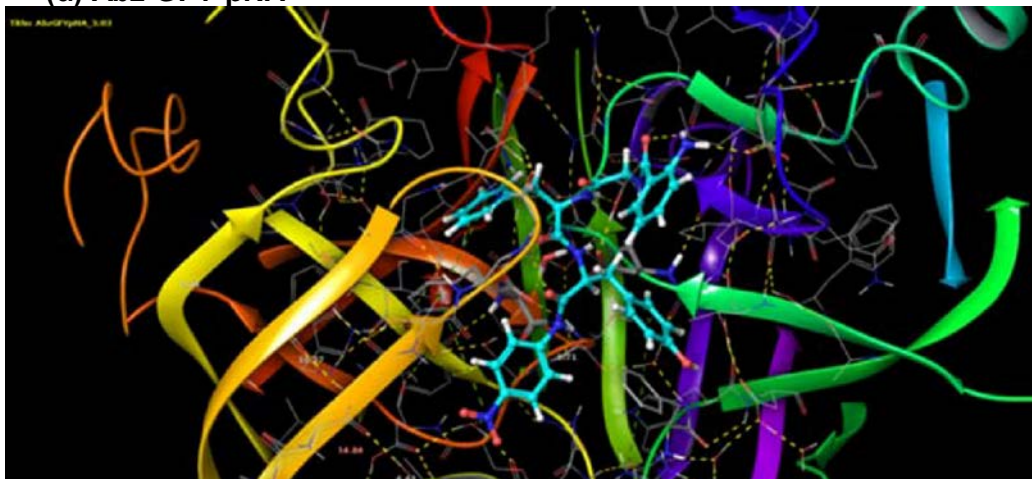
FRET-παράγωγα	Glide XP Docking Score	Glide XP energy (kcal/mol)	*Glide Emodel	Απόσταση (Å)
Abz-SFY-pNA	-9.631	-73.217	-112.228	3.03
Abz-SYY-pNA	-7.901	-76.838	-115.968	3.20
Abz-GFI-pNA	-8.757	-72.600	-108.105	3.09
Abz-GFY-pNA	-8.318	-75.238	-115.298	3.03
Abz-GYI-pNA	-7.518	-65.068	-92.088	2.96
Abz-GNSFY-pNA	-10.060	-84.852	-146.325	2.94

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι τα καλύτερα FRET-πεπτιδικά παράγωγα με βάση την τιμή του Glide XP docking score είναι τα Abz-GNSFY-pNA (-10.060), Abz-SFY-pNA (-9.631), Abz-GFI-pNA (-8.757) και Abz-GFY-pNA (-8.318). Τα παράγωγα Abz-SYY-pNA και Abz-GYI-pNA παρουσίασαν αρκετά υψηλότερες τιμές -7.901 και -7.518 αντίστοιχα. Η Glide score είναι μια εμπειρική συνάρτηση η οποία προσεγγίζει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του υποκαταστάτη (ligand) και οι υψηλότερες αρνητικές τιμές υποδεικνύουν καλύτερη αλληλεπίδραση πρόσδεσης. Αξιοσημείωτες αριθμητικές διαφορές μεταξύ των παραγώγων δεν προκύπτουν εάν εξετάσει κανείς τις τιμές της ενέργειας Glide, με εξαίρεση το παράγωγο Abz-GNSFY-pNA για το οποίο υπολογίστηκε μια εξαιρετικά υψηλή αρνητική ενέργεια πρόσδεσης και το παράγωγο Abz-GYI-pNA που εμφάνισε ιδιαίτερα χαμηλή ενέργεια πρόσδεσης παράλληλα με την χαμηλότερη τιμή Glide score. Τέλος όσον αφορά την απόσταση σε Å, όλα τα παράγωγα παρουσίασαν τιμές μικρότερες των 3.5 Å που είναι το όριο για αποτελεσματική κατάλυση.

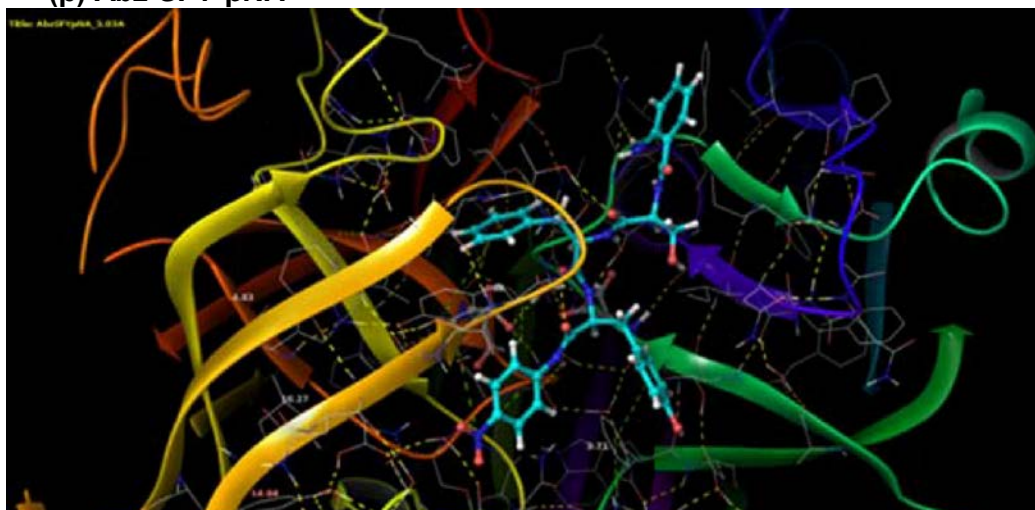
Στην **Εικόνα 3.4α-β** παρουσιάζεται ο τρόπος πρόσδεσης των βέλτιστων προβλεπόμενων διαμορφώσεων των FRET-πεπτιδίων Abz-GFY-pNA και

Abz-SFY-pNA στην ενεργό περιοχή της MPR, όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης. Τα δύο αυτά υποστρώματα προεδένονται με παρόμοιο τρόπο στην ενεργό περιοχή της MPR, όπου παρατηρείται ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου στο οποίο συμμετέχουν τα καταλυτικά κατάλοιπα  $D^{215}$  και  $D^{32}$  και το καταλυτικό μόριο  $H_2O$ , ενώ αξιοσημείωτος είναι κι ένας ακόμη δεσμός υδρογόνου μεταξύ της  $G^{76}$  (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου  $F$  του υποστρώματος. Τέλος παρατηρούνται κάποιες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος οι οποίες συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση των παραγώγων αυτών στην ενεργό περιοχή της MPR.

(α) Abz-GFY-pNA



(β) Abz-SFY-pNA



**Εικόνα 3.4:** Υπολογιστικά αποτελέσματα της πρόσδεσης των παραγώγων (α) Abz-GFY-pNA και (β) Abz-SFY-pNA στην ενεργό περιοχή της MPR.

Σε κάθε περίπτωση οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις για τα έξι αυτά παράγωγα (Πίνακας 3.4), όπως προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης επαναβαθμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την προσέγγιση MM-GBSA (ενότητα 2B.2.3) και υπολογίστηκαν οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου FRET-πεπτιδικού παραγώγου (Πίνακας 3.5).

**Πίνακας 3.5:** Υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης κάθε συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος με την προσέγγιση MM-GBSA

FRET- παράγωγα	$\Delta G$ Ενέργειας πρόσδεσης	$\Delta G$ Ενέργειας Coulomb	$\Delta G$ Ενέργειας ομοιοπολικών αλλ/δράσεων	$\Delta G$ Ενέργειας δεσμών H
<b>Abz-SFY-pNA</b>	-73.83	39.26	6.66	-1.25
<b>Abz-SYY-pNA</b>	-48.28	52.72	5.60	-1.53
<b>Abz-GFI-pNA</b>	-67.75	-44.60	0.36	-0.21
<b>Abz-GFY-pNA</b>	-61.49	41.09	3.68	-2.84
<b>Abz-GYI-pNA</b>	-58.18	49.87	-0.78	-0.35
<b>Abz-GNSFY-pNA</b>	-64.50	35.92	-0.12	-3.60

Οι υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) των συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων κυμαίνονται από -48.28 έως -73,83 kcal mol<sup>-1</sup>, με το παράγωγο Abz-SFY-pNA να επιδεικνύει την χαμηλότερη τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  (ευνοϊκότερη πρόσδεση), ενώ τα παράγωγα Abz-SFY-pNA και Abz-GYI-pNA τις υψηλότερες τιμές  $\Delta G_{\text{bind}}$ . Μεταξύ των ενεργειακών όρων που συνεισφέρουν στην  $\Delta G_{\text{bind}}$ , αξιοσημείωτος είναι η ισχυρή  $\Delta G$  της ενέργειας Coulomb για το παράγωγο Abz-GFI-pNA η οποία όμως αντισταθμίζεται από την μη ευνοϊκή τιμή της  $\Delta G$  δεσμών υδρογόνου. Ένα ακόμη ενδιαφέρον στοιχείο είναι οι υπολογιζόμενες  $\Delta G$  δεσμών υδρογόνου

για τα παράγωγα Abz-GNSFY-pNA και Abz-GFY-pNA, που υποδεικνύουν το σχηματισμό ισχυρών δεσμών υδρογόνου.

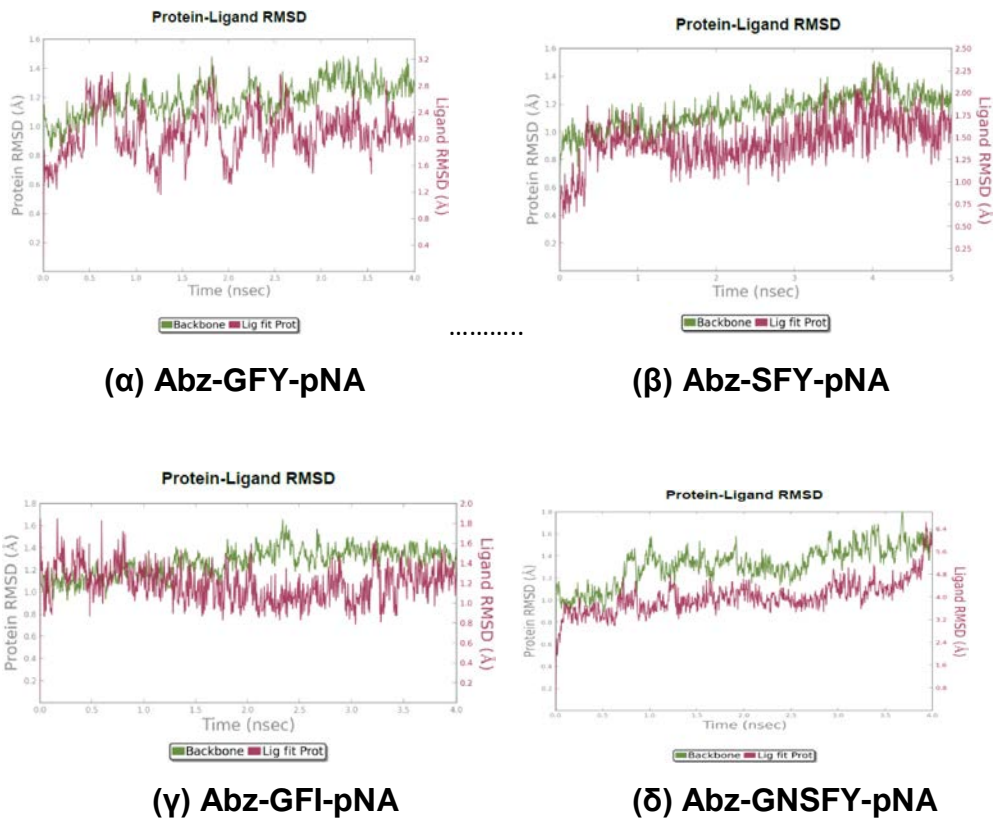
Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης σε συνδυασμό με τις υπολογιζόμενες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης μέσω της προσέγγισης MM-GBSA, θεωρούμε ότι τα παράγωγα Abz-SYY-pNA και Abz-GYI-pNA δεν πληρούν τα χαρακτηριστικά της “ευνοϊκής” πρόσδεσης και δεν θα συμπεριληφθούν σε περαιτέρω μελέτες.

### **3B.2 Προσδιορισμός του είδους και της διάρκειας των αλληλεπιδράσεων (σταθερότητα) των συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων**

Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής διάρκειας 4ns στα ενεργειακά ελαχιστοποιημένα σύμπλοκα MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων που προέκυψαν από προηγούμενο στάδιο (τα σύμπλοκα με την καλύτερη τιμή ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης  $\Delta G$ ), για να ελέγξουμε την σταθερότητα των συμπλόκων αυτών και να προσδιορίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της πρόσδεσης τους στην ενεργό περιοχή της MPR.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όσον αφορά το ένζυμο (MPR) δεν υφίσταται μεγάλες διαμορφωτικές αλλαγές σε σχέση με την αρχική της δομή ( $< 1 \text{ \AA}$ ) σε όλα τα εξετασθέντα σύμπλοκα. Επίσης, οι τιμές RMSD τόσο της MPR όσο και των FRET-πεπτιδικών παραγώγων σταθεροποιούνται σε αποστάσεις μικρότερες των  $2 \text{ \AA}$  με την τιμή RMSD των υποκαταστατών να είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες της MPR, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.5α-δ**, υποδεικνύοντας ότι το ένζυμο διατηρεί μια σταθερή διαμόρφωση και ότι τα παράγωγα αυτά διατηρούν την αρχική θέση πρόσδεσης τους στην MPR.

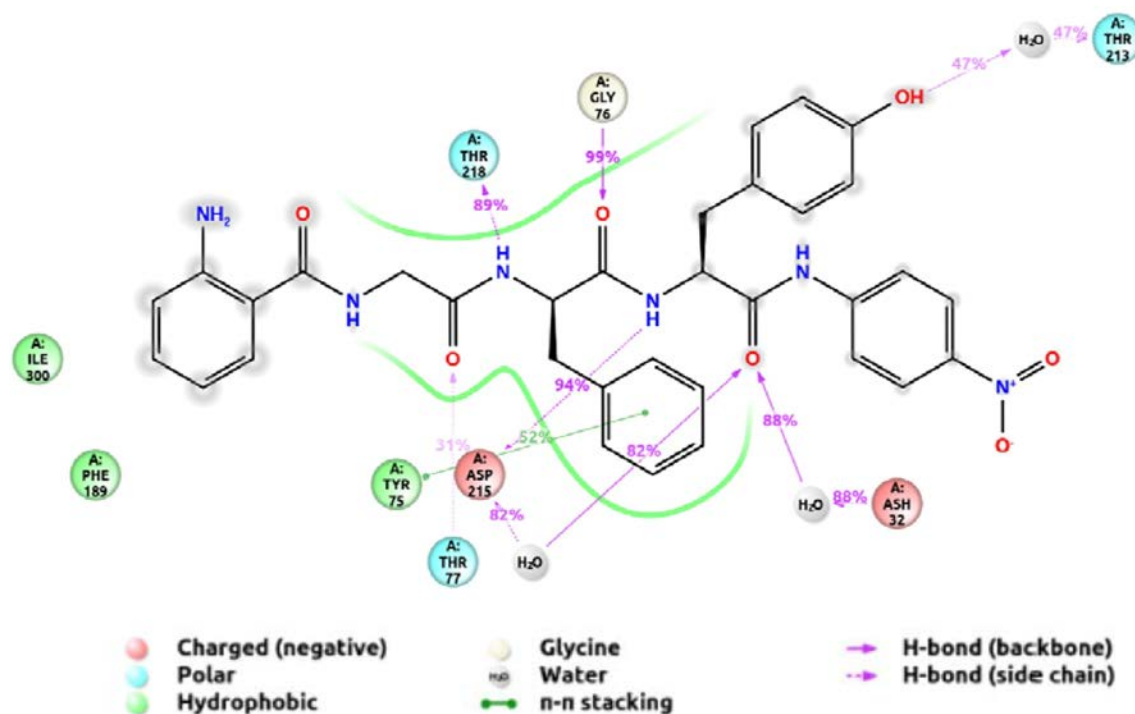




**Εικόνα 3.5:** Οι τιμές RMSD και των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού της MPR, αλλά και των βαρέων ατόμων των FRET-πεπτιδικών παραγώγων (α) Abz-GFY-pNA, (β) Abz-SFY-pNA, (γ) Abz-GFI-pNA και (δ) Abz-GNSFY-pNA. Η RMSD εξέλιξη της MPR βασίστηκε στα  $\alpha$ -άτομα άνθρακα (αριστερός Y-άξονας), ενώ η τιμή RMSD των FRET-πεπτιδικών παραγώγων βασίστηκε σε όλα τα βαρέα του άτομα (δεξιός Y-άξονας), κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD).

Στην **Εικόνα 3.6** παρουσιάζονται τα είδη και η διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** και της MPR.

## Abz-GFY-pNA



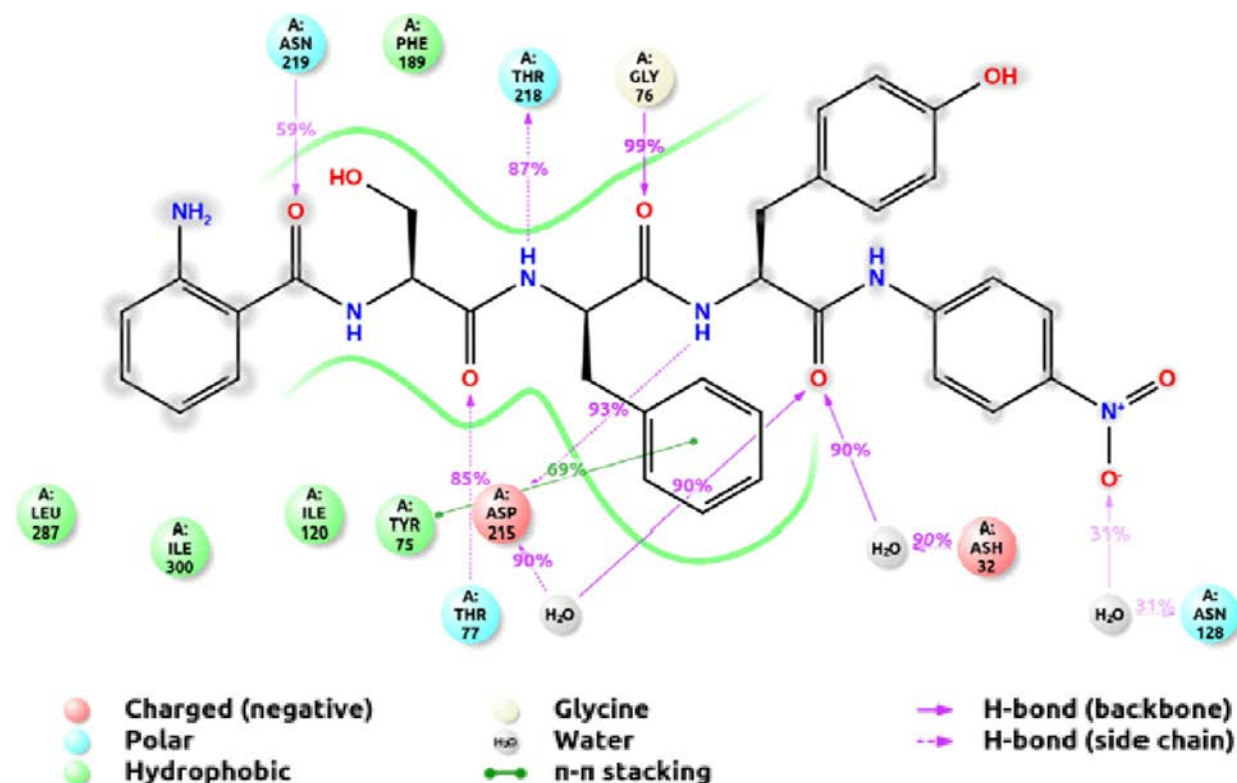
**Εικόνα 3.6:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης.

Το καταλυτικό **D<sup>215</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge acceptor) με το καταλυτικό μόριο **H<sub>2</sub>O**, το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **Y** του υποστρώματος, όπως, επίσης, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το **H-N<** του κατάλοιπου **Y**, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού (υπόστρωμα). Το καταλυτικό **D<sup>32</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge donor) με δεύτερο μόριο **H<sub>2</sub>O**, το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **Y** του υποστρώματος.

Άλλοι δύο σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου είναι αυτός που σχηματίζεται μεταξύ της **G<sup>76</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της **T<sup>218</sup>** (MPR) και του **H-N<** του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος. Παρατηρούμε επίσης μια π-π αλληλεπίδραση του υποστρώματος μέσω του δακτυλίου του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος με την **T<sup>75</sup>** (MPR) η οποία διατηρείται στο 52% του χρόνου της προσομοίωσης.

Στην **Εικόνα 3.7** παρουσιάζονται τα είδη και η διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA** και της MPR.

### Abz-SFY-pNA



**Εικόνα 3.7:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA** κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης.

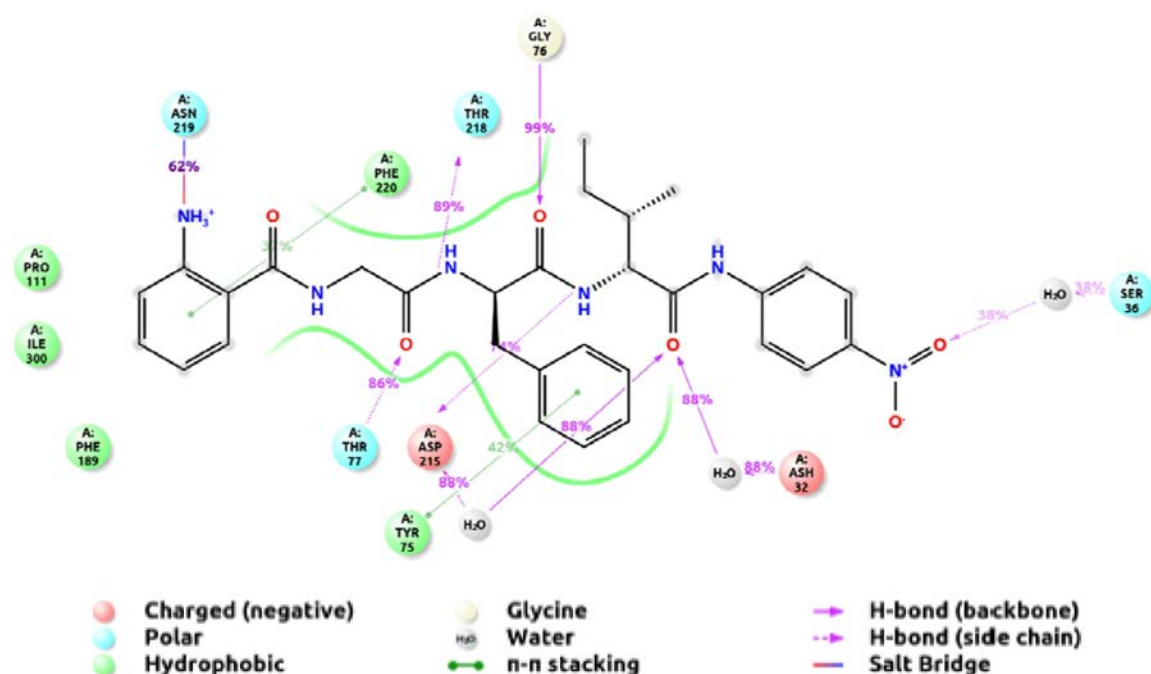
Το καταλυτικό **D<sup>215</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge acceptor) με το καταλυτικό μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **Y** του υποστρώματος, όπως, επίσης, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το **H-N<** του κατάλοιπου **Y** του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού (υπόστρωμα). Το καταλυτικό **D<sup>32</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge donor) με δεύτερο μόριο **H<sub>2</sub>O**, το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **Y** του υποστρώματος.

Άλλοι δύο σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου είναι αυτός που σχηματίζεται μεταξύ της **G<sup>76</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της **T<sup>218</sup>** (MPR) και του **H-N<**

του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος. Επιπλέον, ένας δεσμός υδρογόνου, ο οποίος διατηρείται στο 85% του χρόνου της προσομοίωσης, σχηματίζεται μεταξύ της **T<sup>77</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου **S** του υποστρώματος. Παρατηρούμε επίσης μια π-π αλληλεπίδραση του υποστρώματος μέσω του δακτυλίου του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος με την **T<sup>75</sup>** (MPR) η οποία διατηρείται στο 69% του χρόνου της προσομοίωσης.

Στην **Εικόνα 3.8** παρουσιάζονται τα είδη και η διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος **Abz-GFI-pNA** και της MPR.

### Abz-GFI-pNA



**Εικόνα 3.8:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος **Abz-GFI-pNA** κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης.

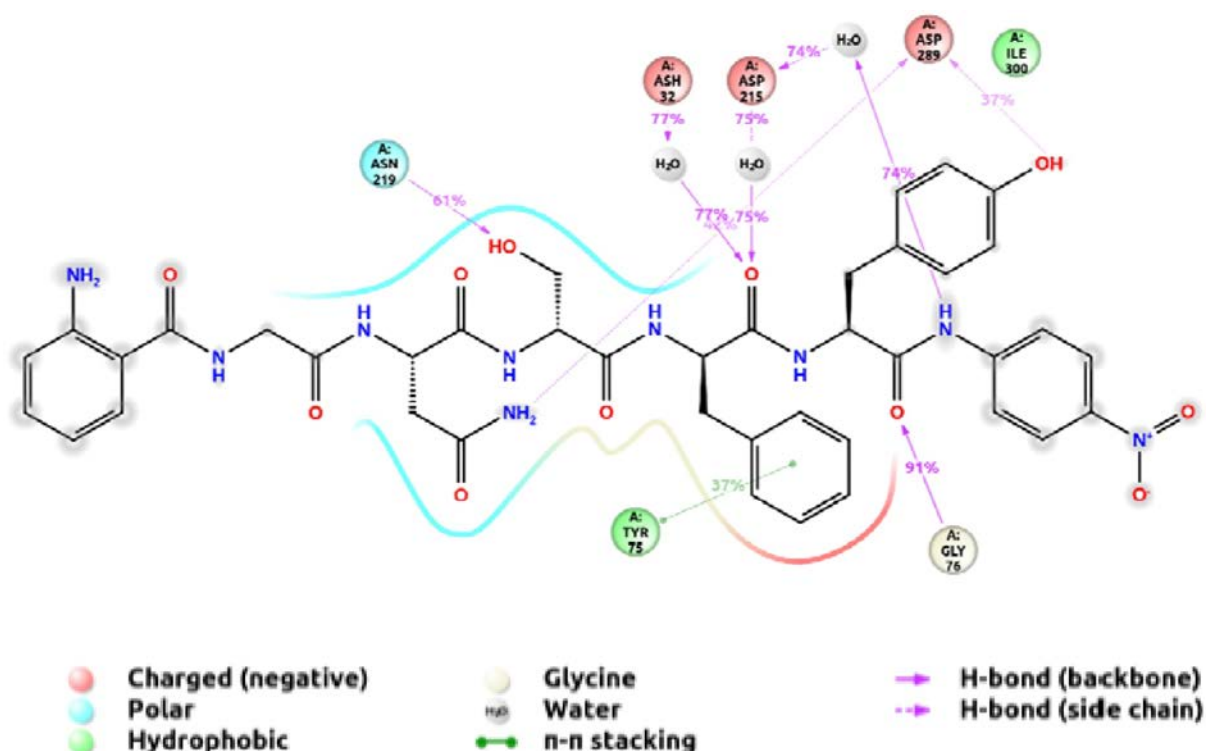
Το καταλυτικό **D<sup>215</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge acceptor) με το καταλυτικό μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **I** του υποστρώματος (και οι δύο αυτοί δεσμοί διατηρούνται στο 88% του χρόνου της προσομοίωσης), όπως, επίσης, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το **H-N<** του κατάλοιπου **I** του υποστρώματος (δηλαδή του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού), που διατηρείται στο 74% του χρόνου της προσομοίωσης. Το

καταλυτικό **D<sup>32</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge donor) με δεύτερο μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **I** του υποστρώματος.

Άλλοι δύο σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου είναι αυτοί που σχηματίζονται (α) μεταξύ της **G<sup>76</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου κατάλοιπου **F** του υποστρώματος και (β) μεταξύ της **T<sup>218</sup>** (MPR) και του **H-N<** του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος. Επιπλέον, ένας ακόμη δεσμός υδρογόνου, ο οποίος διατηρείται στο 86% του χρόνου της προσομοίωσης, σχηματίζεται μεταξύ της **T<sup>77</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου **G** του υποστρώματος. Παρατηρούμε επίσης μια π-π αλληλεπίδραση του υποστρώματος μέσω του δακτυλίου του κατάλοιπου **F** (του υποστρώματος) με την **T<sup>75</sup>** (MPR) που διατηρείται στο 42% του χρόνου της προσομοίωσης και μια γέφυρα άλατος μεταξύ της **H<sub>3</sub>-<sup>+</sup>N<** της ομάδας Abz- του υποστρώματος και του καταλοίπου **N<sup>219</sup>** (MPR).

Στην **Εικόνα 3.9** παρουσιάζονται τα είδη και η διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος **Abz-GNSFY- pNA** και της MPR.

## Abz-GNSFY-pNA



**Εικόνα 3.9:** Λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MPR και του υποστρώματος **Abz-GNSFY-pNA** κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (MD) που συμβαίνουν για > 5.0% του χρόνου προσομοίωσης.

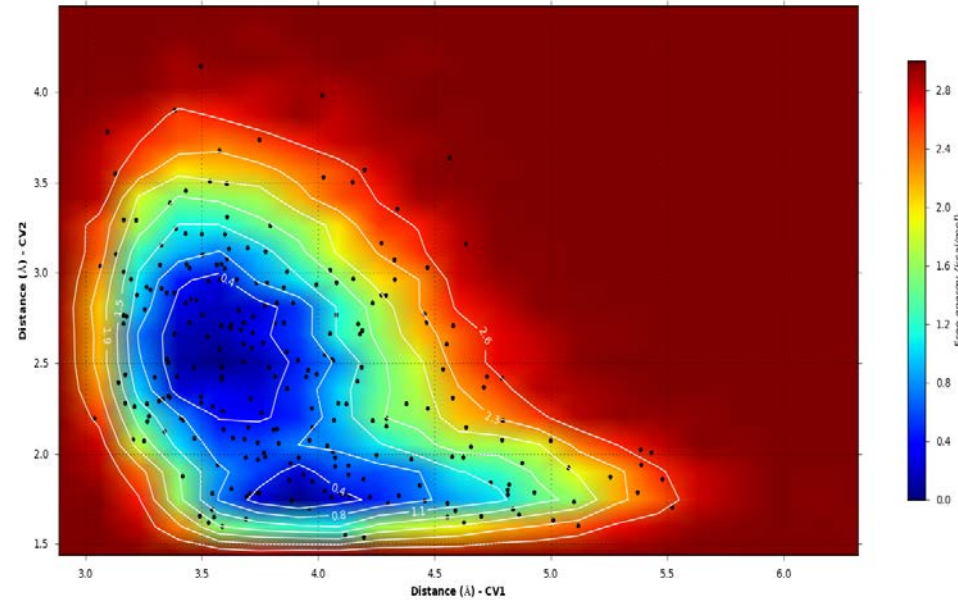
Το καταλυτικό **D<sup>215</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge acceptor) με το καταλυτικό μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος, όπως, επίσης, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με δεύτερο μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την **H-N<** ομάδα της π-νιτροανιλίνης. Το καταλυτικό **D<sup>32</sup>** (MPR) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (water bridge donor) με δεύτερο μόριο **H<sub>2</sub>O** το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό **O** του κατάλοιπου **F** του υποστρώματος. Άλλοι δύο σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου είναι αυτός που σχηματίζεται μεταξύ της **G<sup>76</sup>** (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου **Y** του υποστρώματος και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της **N<sup>219</sup>** (MPR) και της -OH του κατάλοιπου **S** του υποστρώματος. Παρατηρούμε επίσης μια π-π αλληλεπίδραση του υποστρώματος μέσω του δακτυλίου του κατάλοιπου **F**

(του υποστρώματος) με την  $T^{75}$  (MPR), η οποία όμως διατηρείται μόνο στο 37% του χρόνου της προσομοίωσης.

### **3B.3 Επανεξέταση της σταθερότητας των συμπλόκων MPR/FRET-πεπτιδικών παραγώγων**

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2B.2.5 πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μεταδυναμικής για τα σύμπλοκα, της MPR με τα υποστρώματα  $\alpha$ ) Abz-GFY-pNA,  $\beta$ ) Abz-SFY-pNA,  $\gamma$ ) Abz-GFI-pNA και  $\delta$ ) Abz-GNSFY-pNA για περαιτέρω εξέταση της σταθερότητας των συμπλόκων αυτών και τον προσδιορισμό σημαντικών παραμέτρων της καταλυτικής διαδικασίας. Ανακατασκευάστηκε η επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) από τις Γκαουσιανές (Gaussian) συναρτήσεις που προέκυψαν και τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνες 3.10-3.13**), όπου εμφανίζονται τα σημεία της δηγματοληψίας (μαύρες κουκίδες) ενώ οι αριθμοί των περιγραμμάτων (contours) αναφέρονται στο χρόνο που δαπανήθηκε κατά την προσομοίωση μεταδυναμικής (ns).

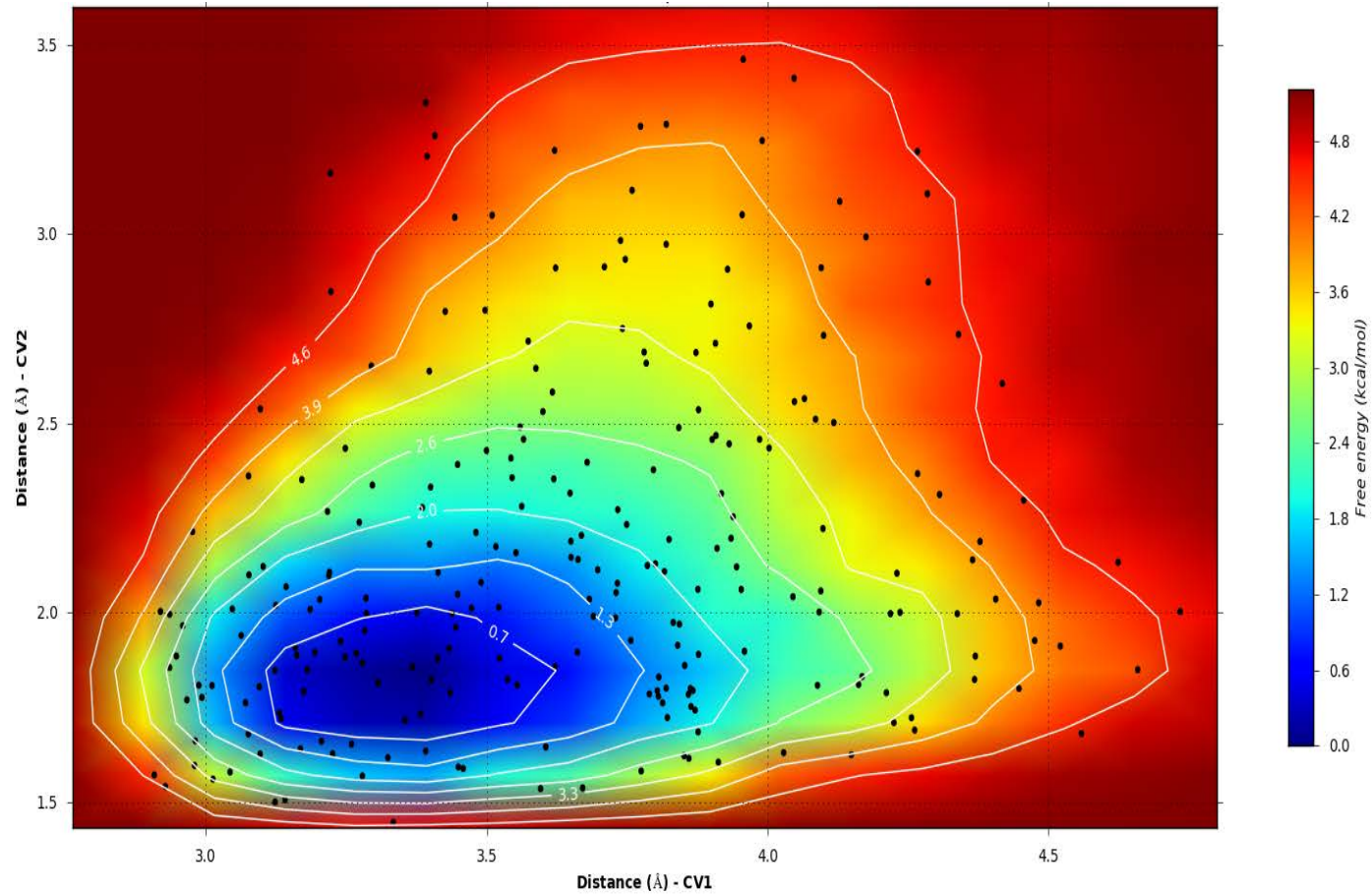
### Υπόστρωμα Abz-GFY-pNA:



**Εικόνα 3.10:** Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** όπου φαίνεται ότι τόσο η απόσταση μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του οξυγόνου του καταλυτικού μορίου H<sub>2</sub>O (**CV1**, ~3.6 Å και ~3.8 Å), αλλά και απόσταση μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλικού άνθρακα, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού και του υδρογόνου του **H-N<** του σκελετού της **G<sup>76</sup>** (**CV2**, ~1.7 Å και ~2.5 Å) σταθεροποιούνται με πολύ χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης (< 0.4 kcal/mol).

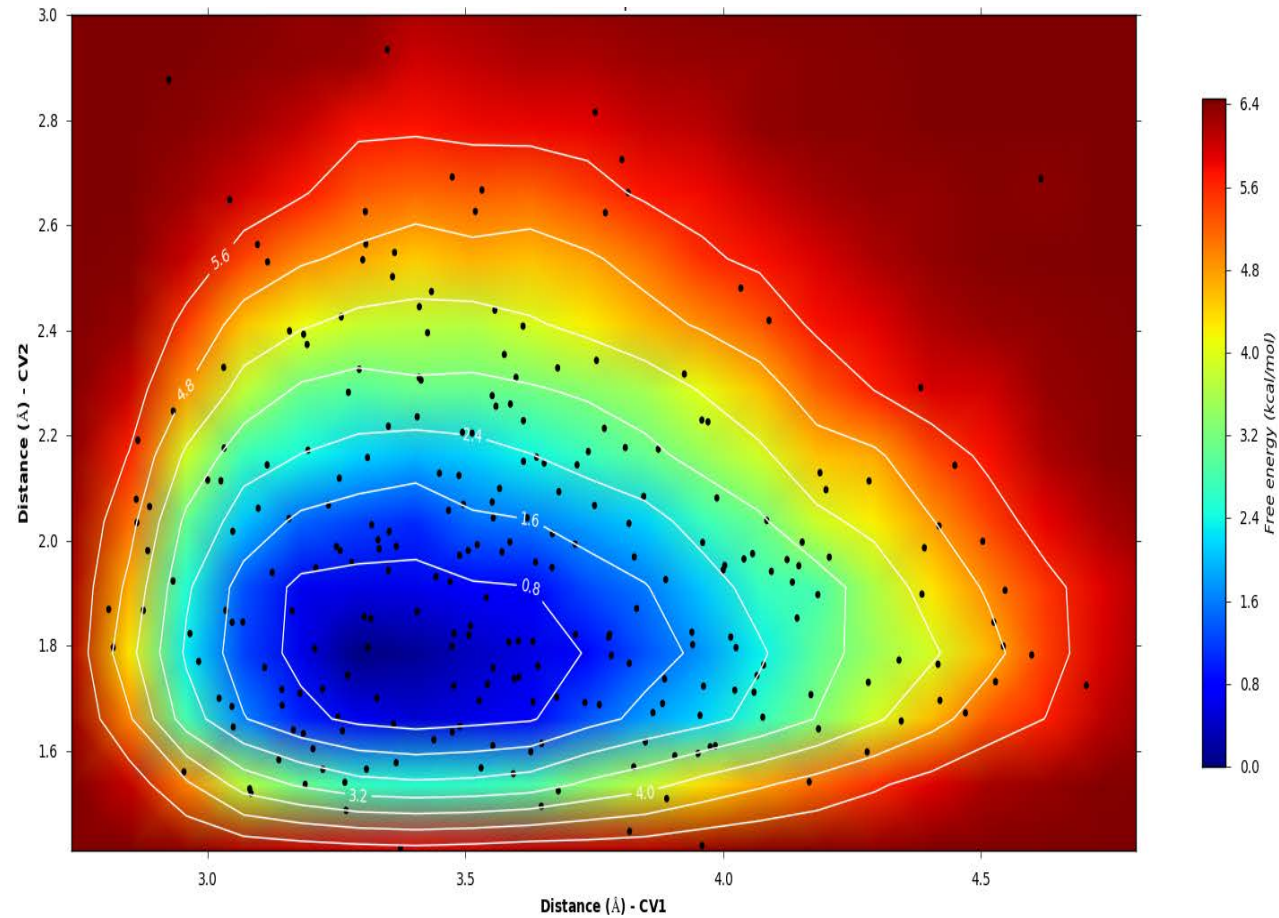


## Υπόστρωμα Abz-SFY-pNA:



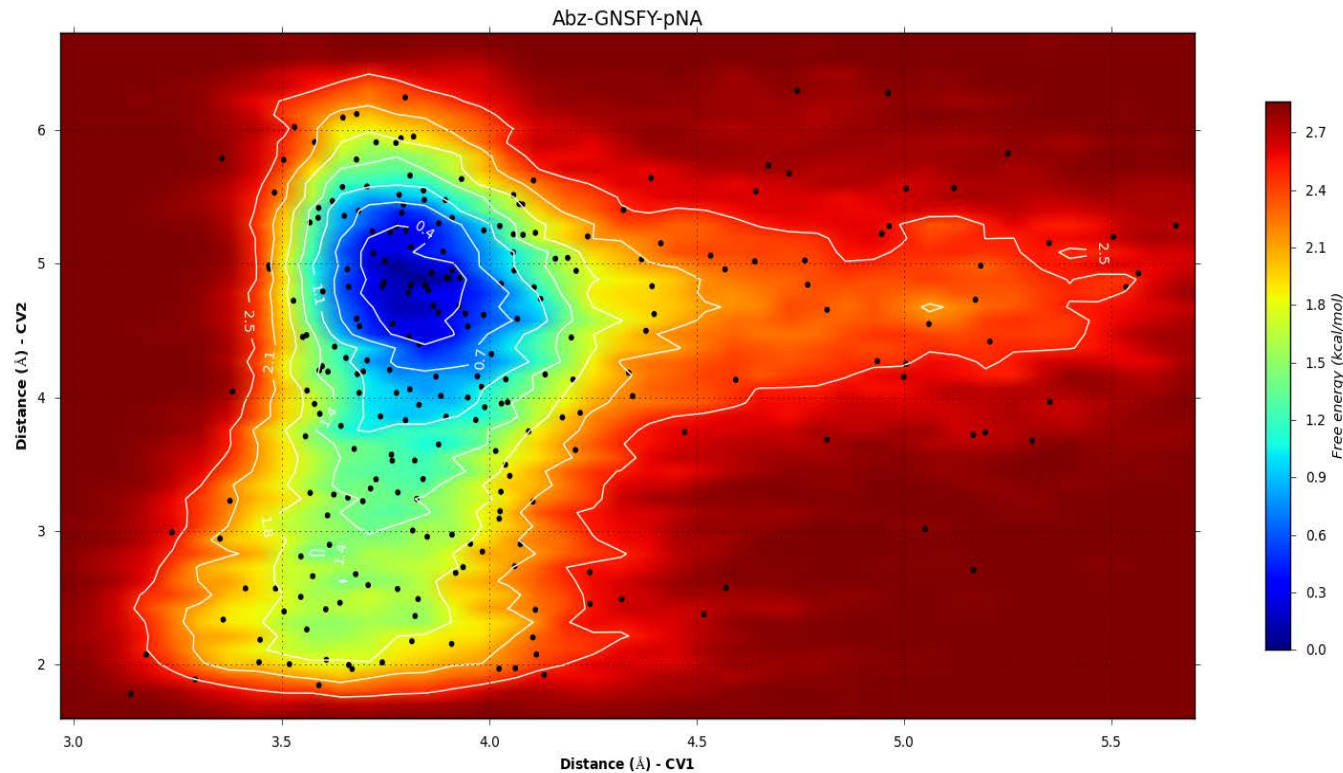
**Εικόνα 3.11:** Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA**: οι αποστάσεις **CV1**, ( $\sim 3.4$  Å) και **CV2** ( $\sim 1.8$  Å), σταθεροποιούνται με σχετικά υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης ( $0.4 < E.E. < 0.7$  kcal/mol).

## Υπόστρωμα Abz-GFI-pNA:



**Εικόνα 3.12:** Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος **Abz-GFI-pNA**: οι αποστάσεις **CV1**, ( $\sim 3.4$  Å) και **CV2** ( $\sim 1.7$  Å), σταθεροποιούνται με σχετικά υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης ( $0.4 < E.E. < 0.8$  kcal/mol).

## Υπόστρωμα Abz-GNSFY-pNA:

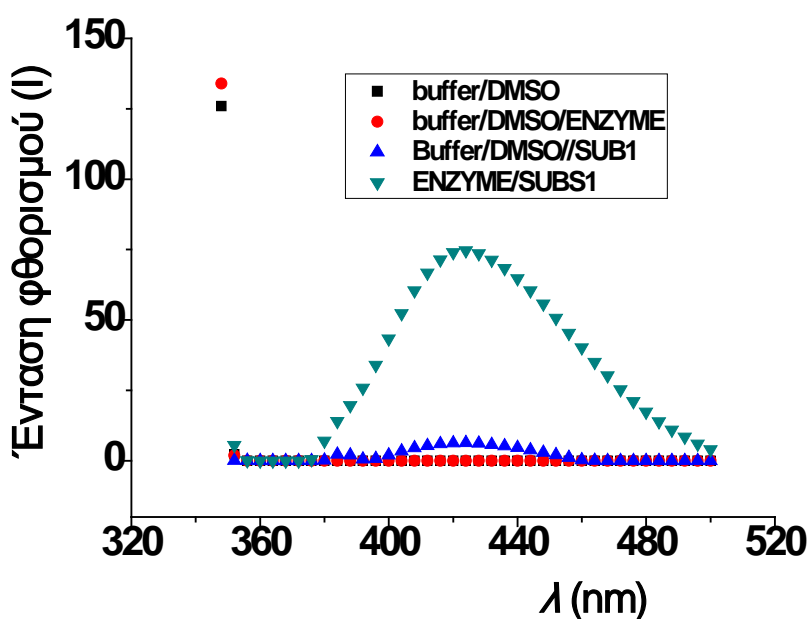


**Εικόνα 3.13:** Επιφάνεια της ελεύθερης ενέργειας (FES) του υποστρώματος **Abz-GNSFY-pNA**: οι αποστάσεις **CV1**, ( $\sim 3.8$  Å) και **CV2** ( $\sim 4.8$  Å) αν και είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τα προηγούμενα FRET-υποστρώματα, ωστόσο σταθεροποιούνται σε πολύ χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης ( $< 0.4$  kcal/mol), κατά πάσα πιθανότητα λόγω της μεγαλύτερης πεπτιδικής αλληλουχίας.

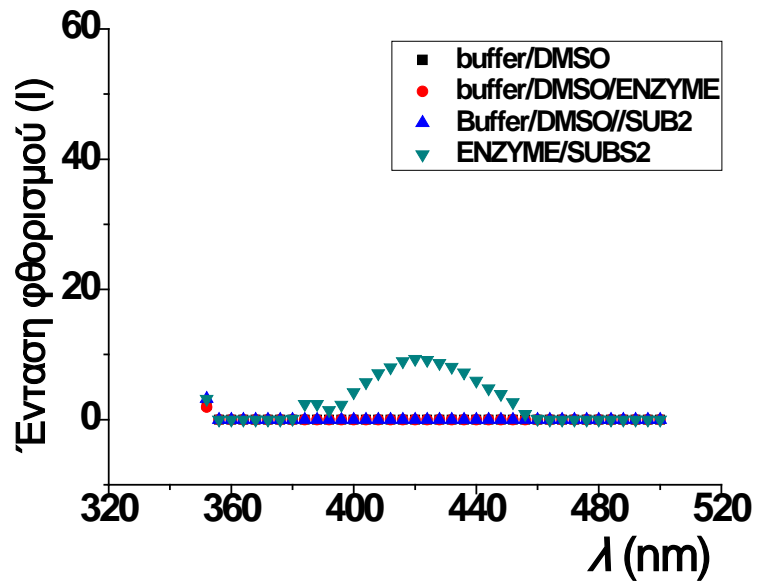
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται καθαρά τόσο η καλύτερη ενεργειακά (χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης) προσέγγιση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA στο ένζυμο MPR, αλλά και η μικρότερη απόστασή τόσο από την διαφαινόμενη σπή οξυανιόντος, η οποία συγκρατεί τον υπό υδρόλυση πεπτιδικό δεσμό σε κατάλληλη θέση, όσο και η απόσταση από το οξυγόνο του καταλυτικού μορίου H<sub>2</sub>O που εγγυάται ευκολότερη και πιο σίγουρη πυρηνόφιλη προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού. Τα προηγούμενα αναφέρονται σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία υπόλοιπα υποστρώματα Abz-SFY-pNA, Abz-GFI-pNA και Abz-GNSFY-pNA και είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα που προέκυψαν από την κινητική μελέτη αυτών που θα παρουσιαστεί στην συνέχεια.

### 3B.4 FRET-παράγωγα ως υποστρώματα της MPR

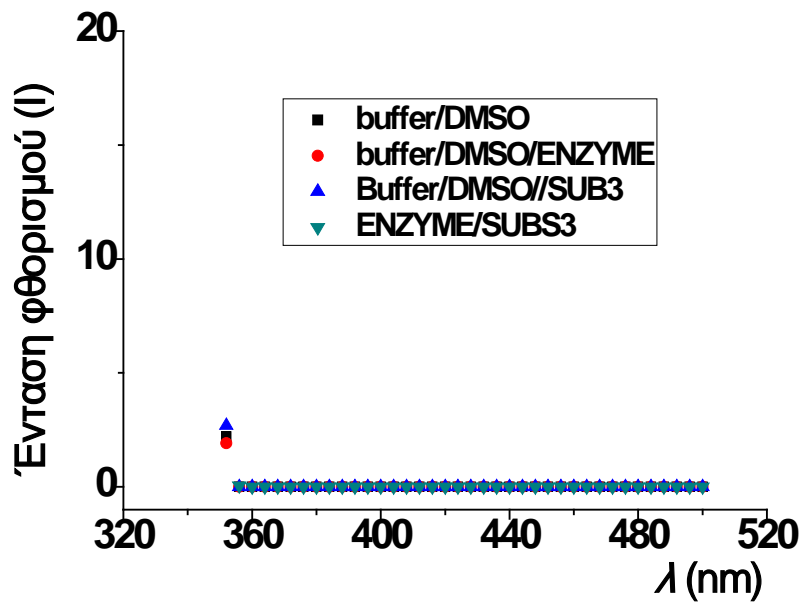
Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2B.4.2 ελήφθησαν φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αντίδραση της MPR επί των τεσσάρων νεοσυντεθέντων FRET-παράγωγων, καθώς και φάσματα ελέγχου, σε ένα εύρος  $\lambda_{em} = 340 - 500$  nm, για να διαπιστωθεί εάν τα παράγωγα αυτά συνιστούν υποστρώματα του ενζύμου αυτού. Τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε παράγωγο ξεχωριστά παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.10α-δ**.



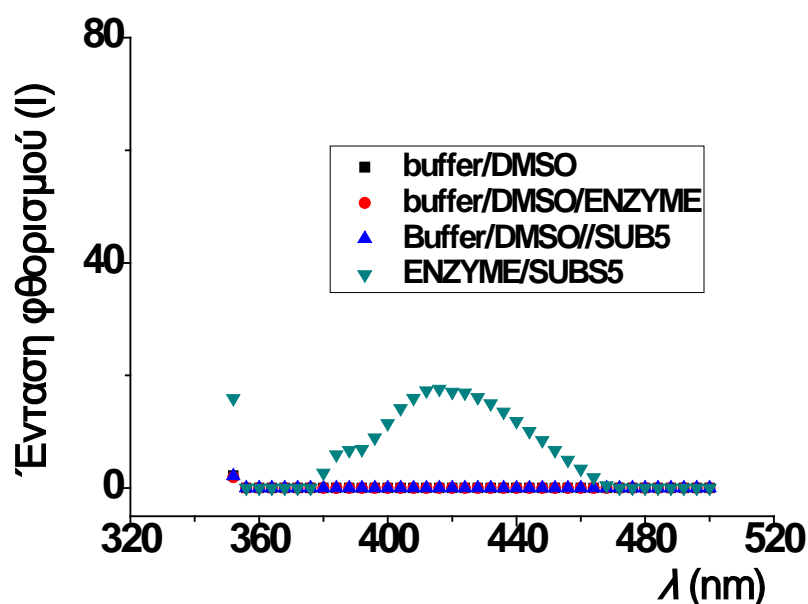
(α) Abz-GFY-pNA



(β) Abz-SFY-pNA



(γ) Abz-GNSFY-pNA



(δ) Abz-GFI-pNA

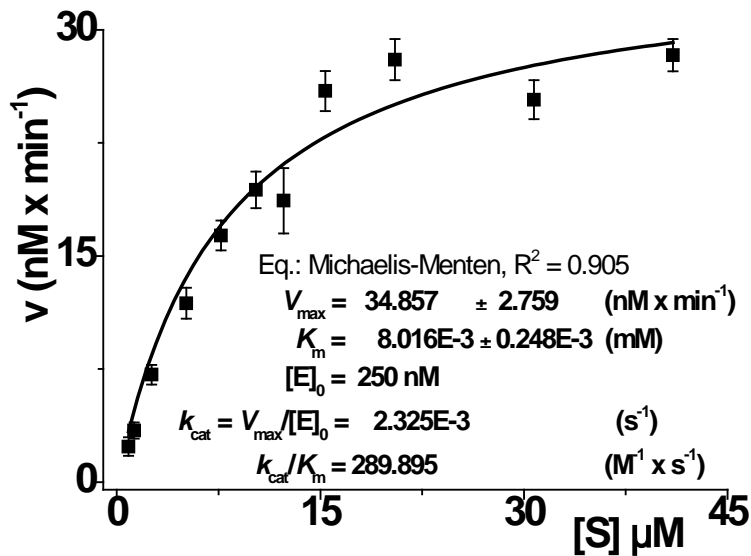
**Διάγραμμα 3.10:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού σε  $\lambda_{em} = 340 - 500$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm της δράσης της MPR επί των FRET-παραγώγων (α) Abz-GFY-pNA, (β) Abz-SFY-pNA, (γ) Abz-GNSFY-pNA και (δ) Abz-GFI-pNA

Από τα φάσματα εκπομπής που ελήφθησαν είναι εμφανές ότι μόνο τρία παράγωγα και συγκεκριμένα τα παράγωγα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, παρουσιάζουν φθορισμό με μέγιστο  $\lambda_{em} = 415$ nm και δεδομένου ότι η ένταση του φθορισμού είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά της ενζυμικής υδρόλυσης διαπιστώνεται ότι συνιστούν υποστρώματα της MPR. Το παράγωγο Abz-GNSFY-pNA δεν επέδειξε φθορισμό στο δεδομένο χρόνο αντίδρασης κι έτσι δεν πληρεί τα χαρακτηριστικά για περαιτέρω μελέτη.

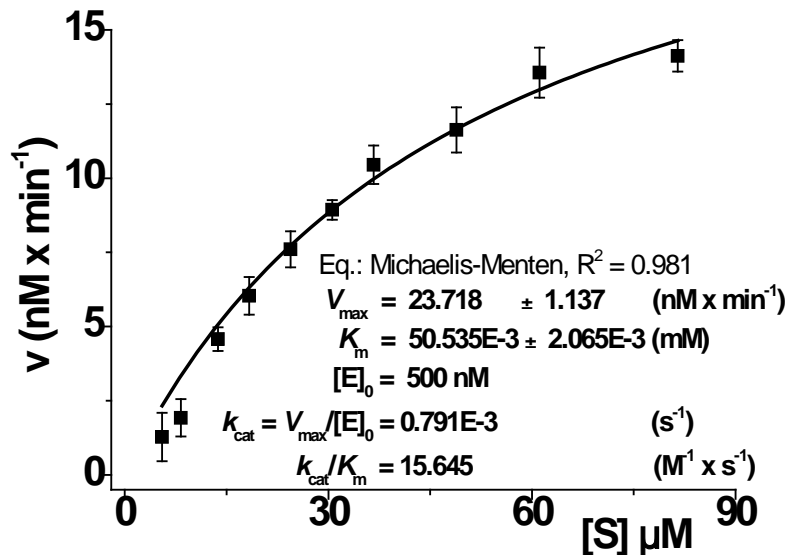
### 3B.5 Κινητική της MPR με τα νεοσυντεθέντα FRET-πεπτιδικά υποστρώματα

Τα πειραματικά δεδομένα από τις αρχικές ταχύτητες της αντίδρασης της MPR επί των υποστρώματων (i) Abz-GFY-pNA, (ii) Abz-SFY-pNA και (iii) Abz-GFI-pNA, σε  $\theta=37^{\circ}\text{C}$  και τιμή  $\text{pH}=3.70$  του μέσου της αντίδρασης, προσαρμόστηκαν με την εξίσωση Michaelis-Menten (**Διαγράμματα 3.11-**

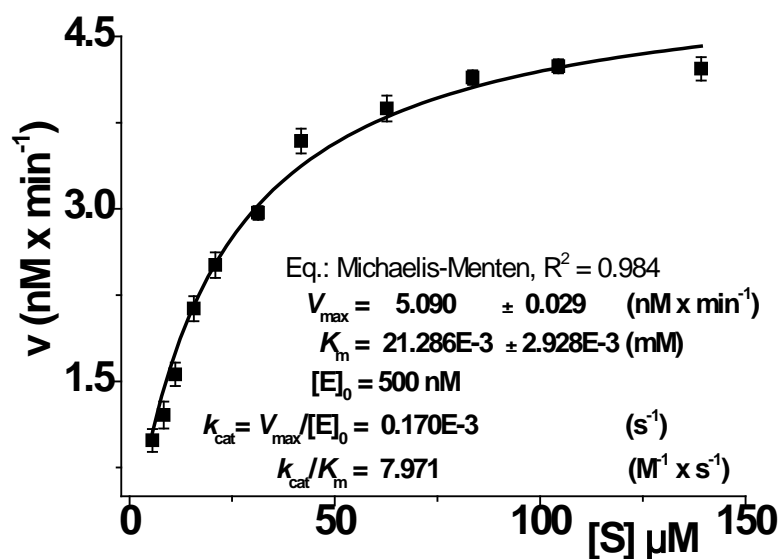
3.13) και υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$ . Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον ένθετο πίνακα των αντίστοιχων Διαγραμμάτων.



**Διάγραμμα 3.11:** Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα **Abz-GFY-pNA**. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/K_m$  ( $\theta = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 3.70$ ).



**Διάγραμμα 3.12:** Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα **Abz-SFY-pNA**. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/K_m$  ( $\theta = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 3.70$ ).



**Διάγραμμα 3.13:** Καμπύλη Michaelis-Menten της MPR με το υπόστρωμα **Abz-GFI-pNA**. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/K_m$  ( $\theta = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 3.70$ ).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 3.11-3.13**) φαίνεται καθαρά ότι:

( $\alpha$ ) Η μέγιστη δυνατή  $[S]$ , στην οποία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τριών διαφορετικών υποστρωμάτων και οφείλεται στην δυνατότητα ανίχνευσης στατιστικά μετρήσιμου φθορισμού. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε η μισή  $[E]_0$  για το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA.

( $\beta$ ) Η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  για το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA υπολογίστηκε σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη των λοιπών δύο υποστρωμάτων υποστηρίζοντας την καλύτερη κατάταξή του ως δραστικότερου. Το προηγούμενο συμπέρασμα ενισχύεται και από τις υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $k_{cat}$  και  $K_m$  των τριών υποστρωμάτων, όπου είναι εξίσου εμφανείς οι μεγάλες διαφορές μεταξύ του υποστρώματος Abz-GFY-pNA και των δύο υπολοίπων και ως ισχυρότερα προσδεόμενο στο χρησιμοποιηθέν ένζυμο (6 και 3 φορές, αντίστοιχα), αλλά και ως ταχύτερα αντιδρών (3 και 13 φορές, αντίστοιχα).

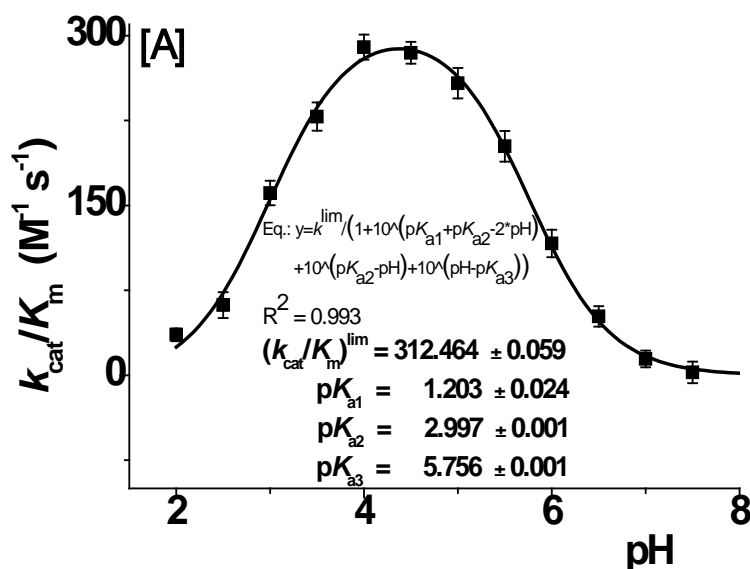
( $\gamma$ ) Επιπλέον, με χρήση του υποστρώματος Abz-SFY-pNA, δεν έγινε δυνατό να επιτευχθεί κινητική κορεσμού και επομένως οι υπολογισθείσες

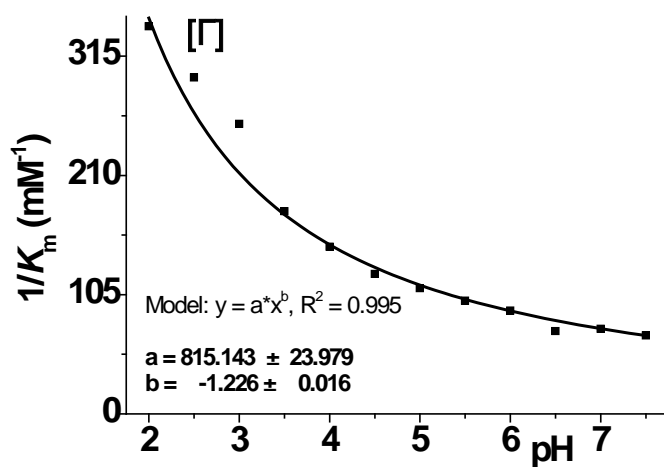
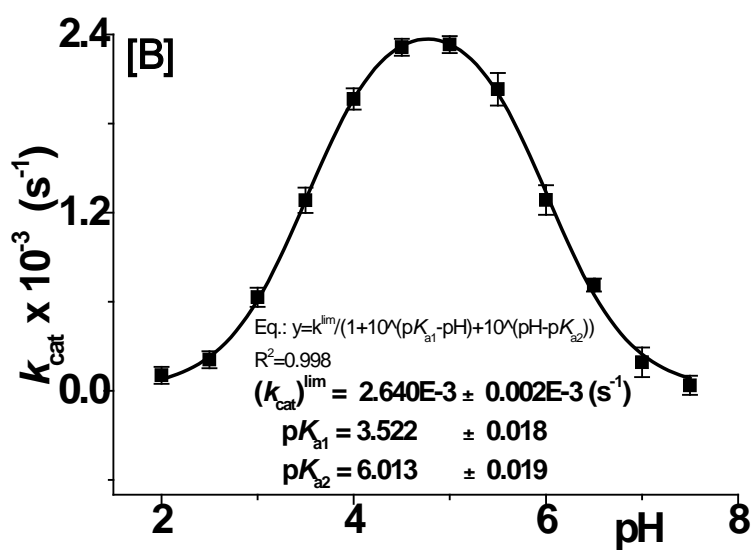


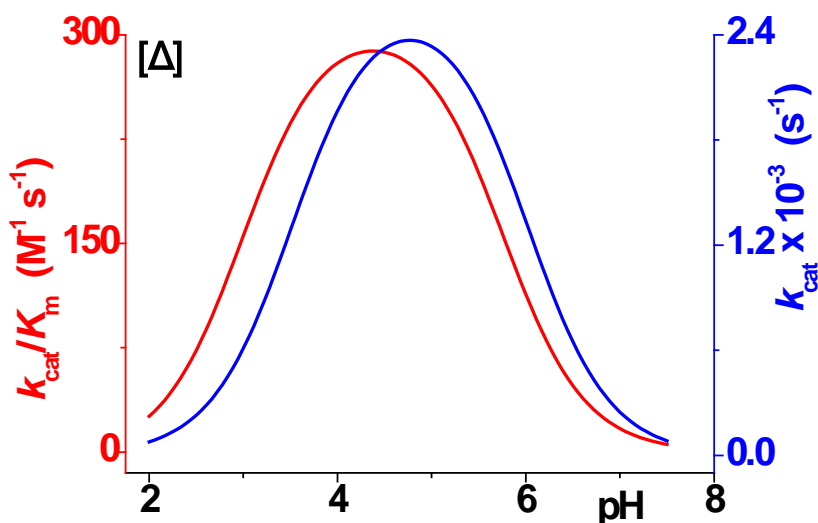
τιμές των παραμέτρων Michaelis-Menten προφανώς εμπεριέχουν μεγαλύτερα σφάλματα, σε σύγκριση με τα υποστρώματα Abz-GFY-pNA και Abz-GFI-pNA.

### 3B.6 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $1/K_m$ της MPR, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων $pK_a$

Στην Ενότητα 2B.6 μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $1/K_m$  της υδρόλυσης του υποστρώματος Abz-GFY-pNA από την MPR. Στη συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα των εξαρτήσεων  $(k_{cat}/K_m)=f(\text{pH})$ ,  $(k_{cat})=f(\text{pH})$  και  $(1/K_m)=f(\text{pH})$  προσαρμόστηκαν με τις εξισώσεις (1.12 - 1.14), με τη χρήση του προγράμματος Origin και προσδιορίστηκαν οι αντίστοιχες τιμές  $pK_a$ . Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής για την MPR παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.14A-Δ** και στα αντίστοιχα ένθετα. Η εξίσωση (1-13) προσάρμοσε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα ( $\text{pH}$ ,  $k_{cat}/K_m$ ), ενώ η εξίσωση (1-12) προσάρμοσε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα ( $\text{pH}$ ,  $k_{cat}$ ).







**Διάγραμμα 3.14 :** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A** [ $(k_{cat}/K_m)=f(pH)$ ], **B** [ $(k_{cat})=f(pH)$ ] και **Γ** [ $(1/K_m)=f(pH)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του Abz-GFY-pNA από την MPR. Το Διάγραμμα **Δ** αποτελεί συγκριτική αναπαράσταση των **A-B**.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι για τα παραπάνω διαγράμματα, τα οποία περιγράφουν τις εξαρτήσεις των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $1/K_m$  της MPR, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA, λόγω των κινητικών του χαρακτηριστικών που υπερισχύουν των δύο υπολοίπων υποστρωμάτων. Η εξάρτηση της παραμέτρου  $1/K_m$  προσαρμόστηκε με την εκθετική εξίσωση (φθίνουσα)  $y = ax^b$ , ενώ δεν έγινε δυνατόν να προσαρμοστεί με καμμία σχετική εξίσωση, δείχνοντας εκθετική μείωση της τιμής της με αύξηση της τιμής pH και άρα εκθετική μείωση του ιονισμού του ελεύθερου ενζύμου E στην πορεία προς τον σχηματισμό του. Επίσης, από το Διάγραμμα 3.14Δ, με τις δύο καμπύλες, των εξαρτήσεων των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης φαίνεται ότι το μέγιστο για την παράμετρο  $k_{cat}$  είναι ελαφρά μετατοπισμένο προς την αλκαλική περιοχή (0.5 μονάδα pH).

Όσον αφορά τις τιμές  $pK_a$  που προσδιορίστηκαν, για την περίπτωση της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  μπορούν να αποδοθούν:

(α) Τιμή  $pK_{a1} = 1.20$  οφείλεται πιθανότατα στον ιονισμό ενός μοριακού μορφώματος όπου μία ομάδα αρνητικά φορτισμένου καρβοξυλίου βρίσκεται

πολύ κοντά σε ομάδα **-OH** (π.χ.  $pK_a$  του 2,6-δι-υδροξυ-βενζοϊκού  $\sim 1.22$ ), είτε μπορεί να οφείλεται στον ιονισμό ενός μοριακού μορφώματος όπου δύο ομάδες καρβοξυλίων με διαφορετικό ιονισμό βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους (π.χ.  $pK_a$  του οξαλικού  $\sim 1.20$  και τιμή  $pK_a$  του μηλικού  $\sim 1.60 - 1.80$ ). Στην συγκεκριμένη περίπτωση υπερισχύουν οι πιθανότητες για την πρώτη από τις δύο προαναφερόμενες περιπτώσεις, δηλαδή ότι η συγκεκριμένη τιμή  $pK_a$  1.20 αντιστοιχεί στον ιονισμό μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου καρβοξυλίου του καταλυτικού  $D^{216}$  και της ομάδας **-OH** του καταλυτικού μορίου  $H_2O$ ,

(β) Τιμή  $pK_{a2} = 3.00$  φαίνεται ότι αντιστοιχεί στην αλλαγή ιονισμού του καταλυτικού  $D^{216}$  και την δημιουργία μίας πρωτονικής γέφυρας σε μεταβατική κατάσταση ( $TS_2$ , μηχανισμός του **Σχήματος 4.3**) Η τιμή  $pK_a$  της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού έχει αναφερθεί  $\sim 3.65$ , αλλά είναι αναμενόμενη μια φαινομενική μείωσή της λόγω της δημιουργίας της πρωτονικής γέφυρας σε μεταβατική κατάσταση ( $TS_2$ , μηχανισμός του **Σχήματος 4.3**)

(γ) Τιμή  $pK_{a3} = 5.76$  είναι συμβατή με την πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του ατόμου **N**, του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού, στο άτομο υδρογόνου του καρβοξυλίου του καταλυτικού  $D^{216}$ .

Αντίστοιχα για την περίπτωση της παραμέτρου  $k_{cat}$  οι τιμές  $pK_a$  που προσδιορίστηκαν μπορούν να αποδοθούν:

(α) Τιμή  $pK_{a1} = 3.52$  οφείλεται πιθανότατα στην γέφυρα πρωτονίου, που σχηματίζεται στην  $TS_3$ , μεταξύ του καρβοξυλικού **O** του καταλυτικού  $D^{216}$  και του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του ατόμου **N** του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού, είτε οφείλεται στον ιονισμό αυτού του καταλοίπου ασπαρτικού (εξάλλου, η τιμή  $pK_a$  της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού έχει αναφερθεί  $\sim 3.65$ )

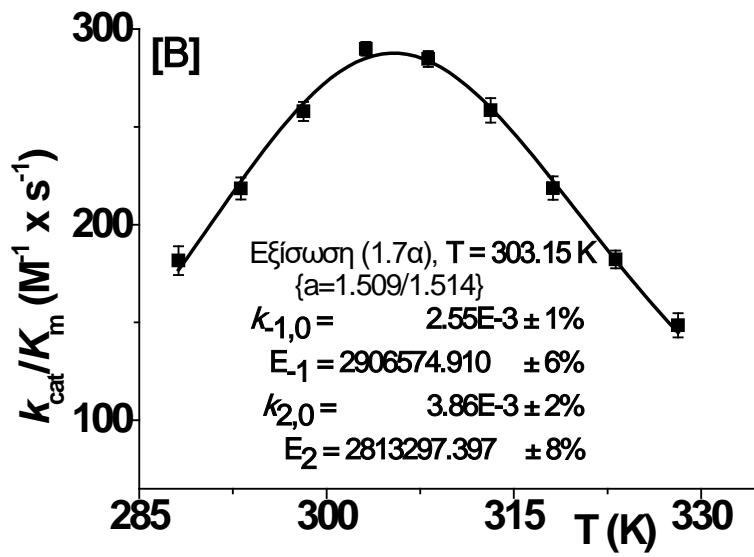
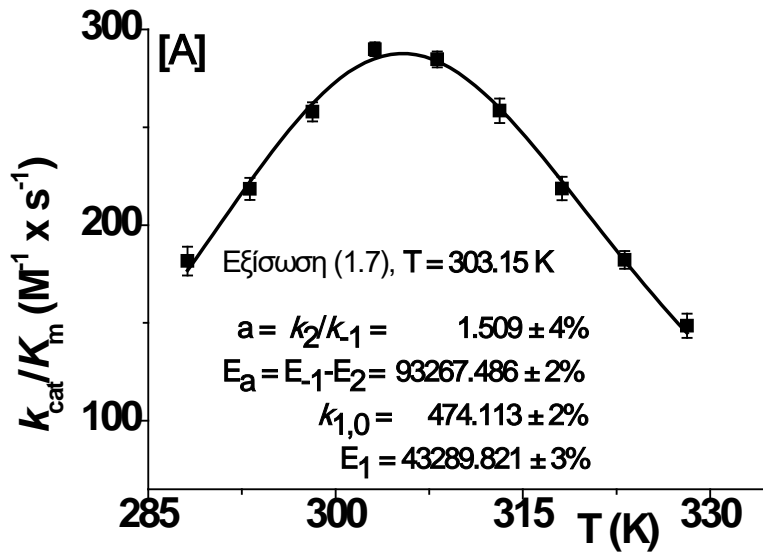
(β). Τιμή  $pK_{a2} = 6.01$  είναι πολύ πιθανό να αντιστοιχεί στην δημιουργία του ουδέτερου ατόμου **N**, της αμίνης ( $P_1$ ), ενός από τα δύο προϊόντα της υδρόλυσης (μία τέτοια τιμή  $pK_a$  είναι χαρακτηριστική για ουδέτερα άτομα **N**)<sup>203</sup>.

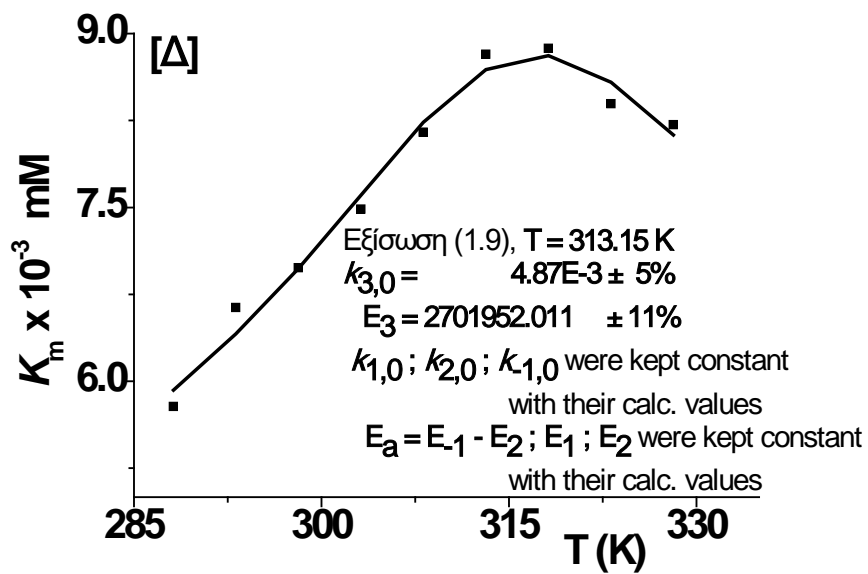
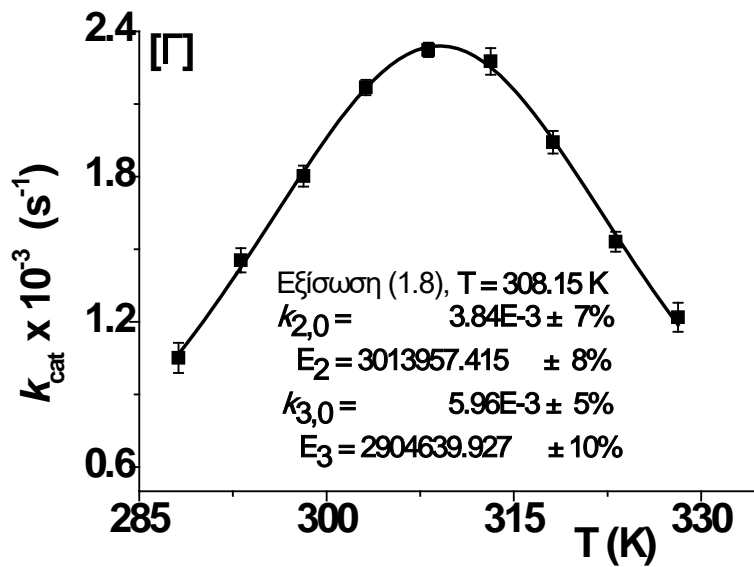
Γενικότερα, ποσοτικοί παράγοντες που τροποποιούν τις παρατηρούμενες τιμές των  $pK_a$  είναι πολλοί και σε αυτούς συγκαταλέγονται

κυρίως επαγωγικές και ηλεκτροστατικές επιδράσεις, καθώς και επιδράσεις μετατόπισης ηλεκτρονίων (φαινόμενα μεσομέρειας) και ενδεχομένως σε συνδυασμό με δεσμούς υδρογόνου, διαμορφωτικές αλλαγές και στερεοχημικά φαινόμενα. Οπουδήποτε λαβαίνει χώρα κάποια διαδικασία σταθεροποίησης ενός κατιόντος σε αντίθεση ως προς το ουδέτερο μόριο, ή σταθεροποίηση ενός ουδέτερου μορίου ως προς το ανιόν του, θα παρατηρείται (θα μετράται) αυξημένη τιμή της αντίστοιχης  $pK_a$  του αντίστοιχου οξέος.

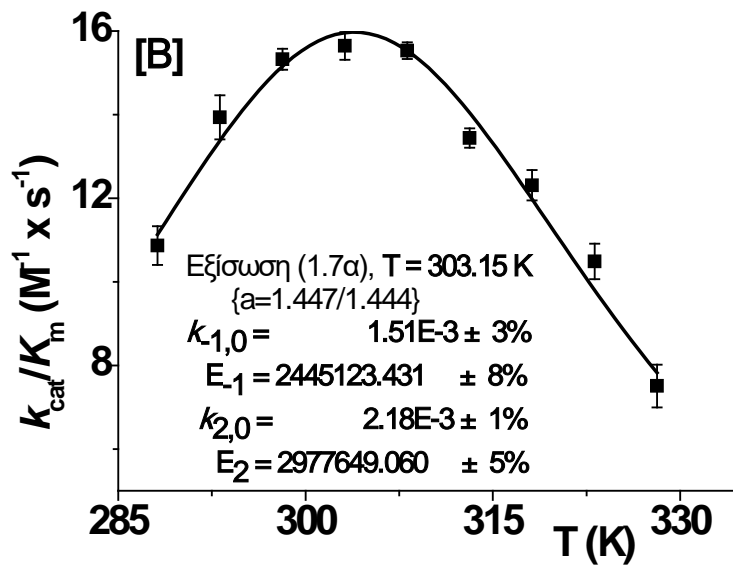
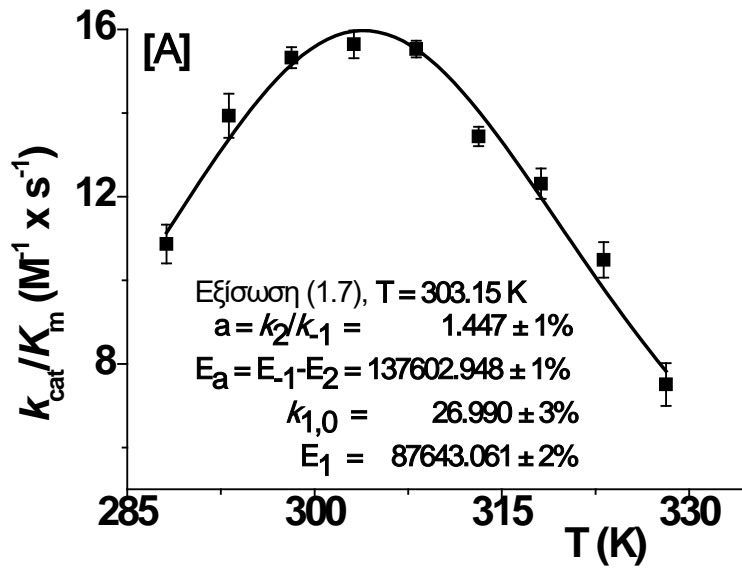
### **3B.7 Μεταβολή των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της MPR ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης και κατασκευή του ενεργειακού διαγράμματος της αντίδρασης**

Αν και για τις εξαρτήσεις των παραμέτρων Michaelis-Menten, ως προς την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε μόνο το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA, ωστόσο για λόγους οι οποίοι θα γίνουν πιο σαφείς παρακάτω, η μεταβολή των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$  με την απόλυτη θερμοκρασία μελετήθηκε και με τα τρία υποστρώματα (i) Abz-GFY-pNA, (ii) Abz-SFY-pNA και (iii) Abz-GFI-pNA (ενότητα 2B.7). Τα πειραματικά δεδομένα  $k_{cat}/K_m = f(T)$ ,  $k_{cat} = f(T)$  και  $K_m = f(T)$  που προέκυψαν για κάθε υπόστρωμα προσαρμόστηκαν με τις εξισώσεις (1.7 - 1.9). Τα αποτελέσματα της προσαρμογής, καθώς και οι μορφές των εξισώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση, παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.15 - 3.17** (στα ένθετα αναφέρονται οι υπολογισθείσες τιμές σημαντικών παραμέτρων).

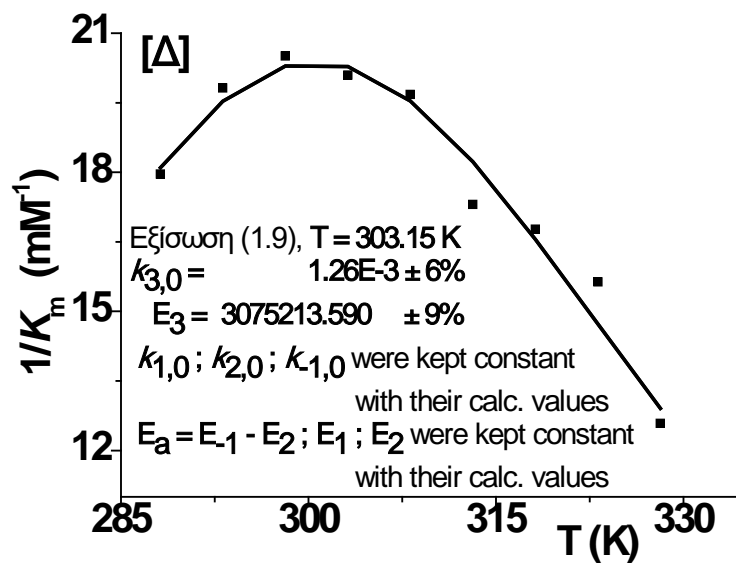
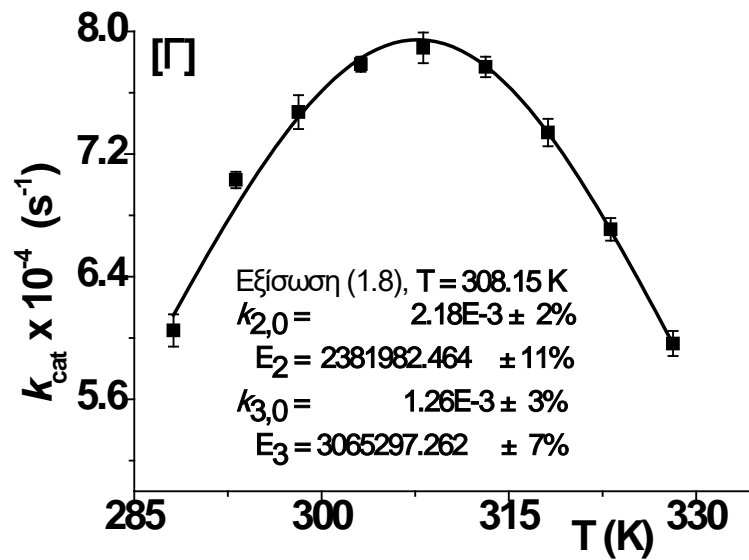




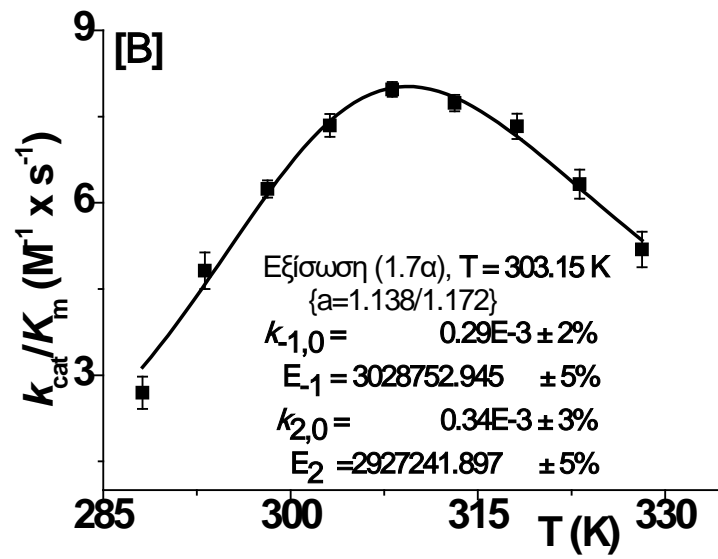
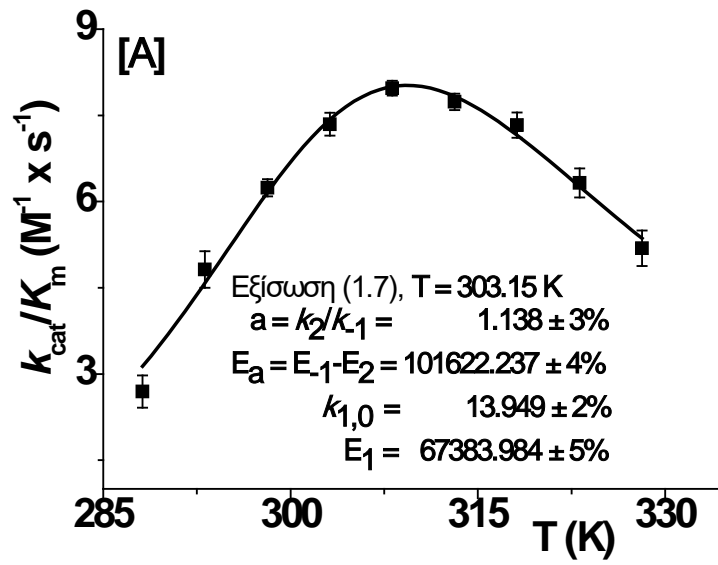
**Διάγραμμα 3.15:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A**, **B** [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], **Γ** [ $(k_{cat})=f(T)$ ] και **Δ** [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** από την MPR.

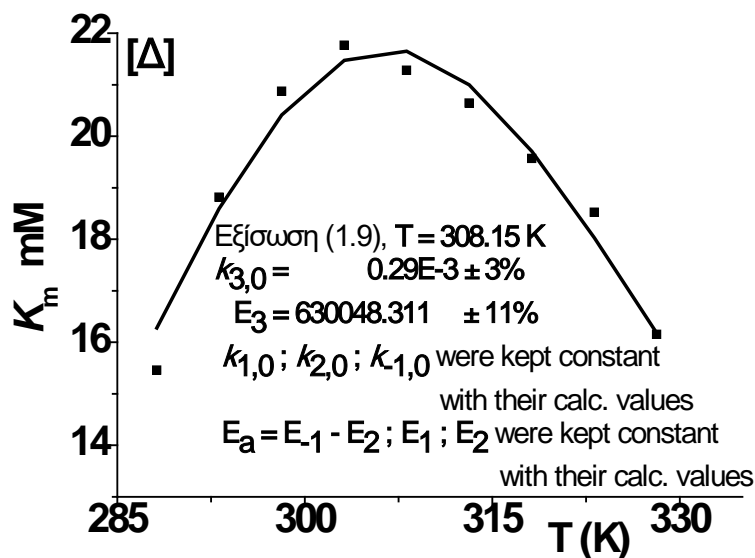
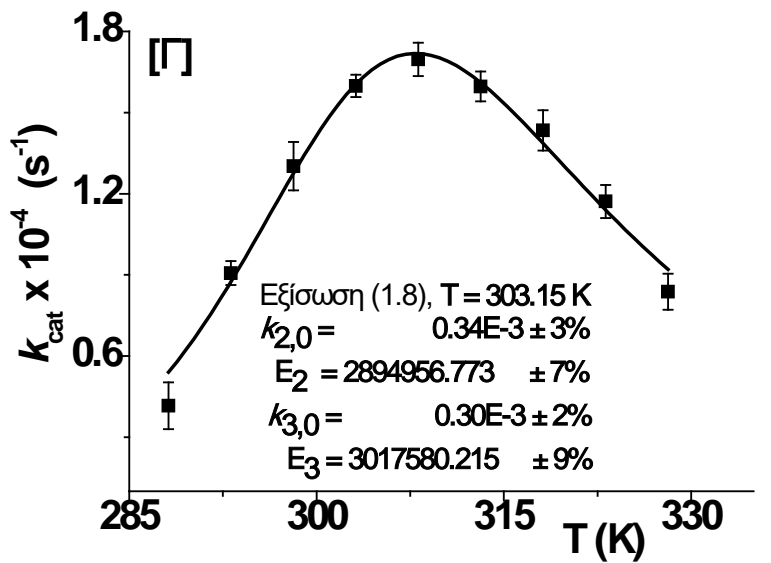






**Διάγραμμα 3.16:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A**, **B**  $[(k_{\text{cat}}/K_m)=f(T)]$ , **Γ**  $[(k_{\text{cat}})=f(T)]$  και **Δ**  $[(K_m)=f(T)]$  για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA** από την MPR.





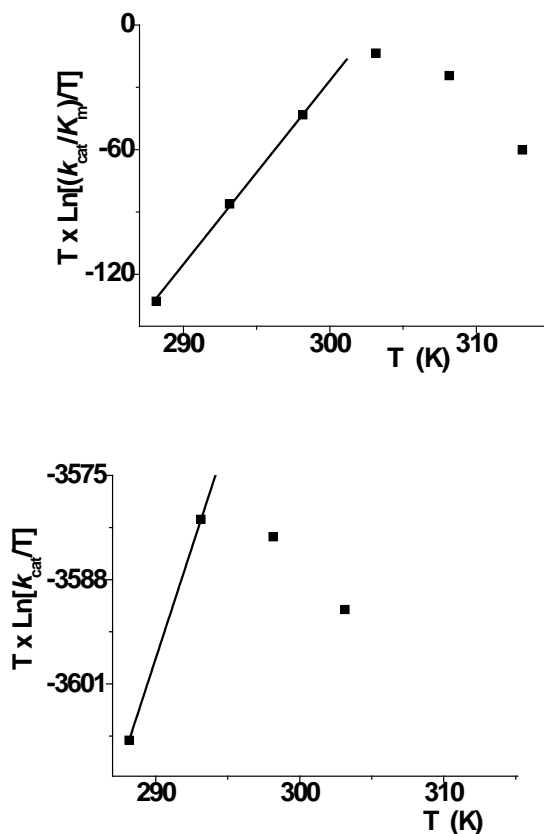
(Δ)

**Διάγραμμα 3.17:** Γραφικές παραστάσεις των εξαρτήσεων: **A**, **B** [ $(k_{cat}/K_m)=f(T)$ ], **Γ** [ $(k_{cat})=f(T)$ ] και **Δ** [ $(K_m)=f(T)$ ] για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος **Abz-GFI-pNA** από την MPR.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (1.10), η οποία στηρίζεται στη σχέση μεταξύ της αλλαγής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs και των αλλαγών στην ενθαλπία και την εντροπία, για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων  $(k_{cat}/K_m)=f(T)$  και  $(k_{cat})=f(T)$  και για τον

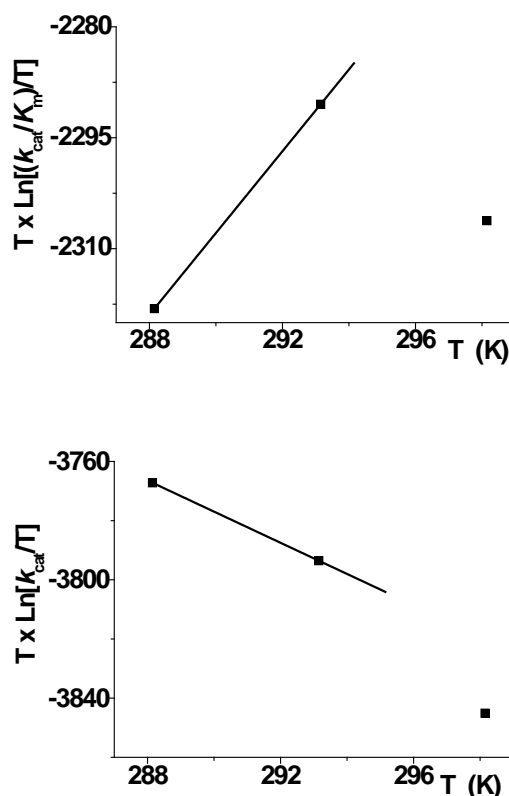
υπολογισμό των αντίστοιχων θερμοδυναμικών παραμέτρων και για τα τρία αυτά υποστρώματα (Διαγράμματα 3.18 - 3.20)

Υπόστρωμα: Abz-GFY-pNA



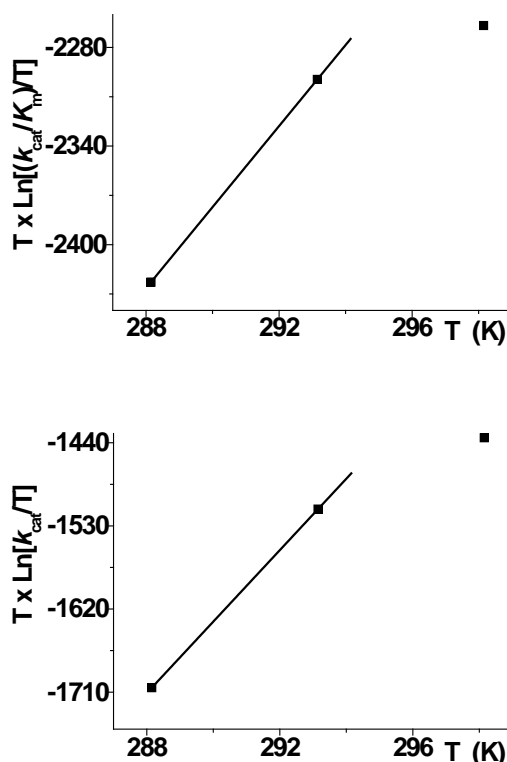
**Διάγραμμα 3.18:** Εξάρτηση των  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος **Abz-GFY-pNA** από την MPR). Υπολογίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι  $\Delta S_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = -123.99 \pm 1.80 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\Delta H_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = 22.29 \pm 0.54 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = 59.88 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , καθώς και οι  $\Delta S_{k_{cat}}^\ddagger = -151.74 \pm 2.03 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\Delta H_{k_{cat}}^\ddagger = 43.19 \pm 0.67 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{k_{cat}}^\ddagger = 89.95 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

## Υπόστρωμα: Abz-SFY-pNA



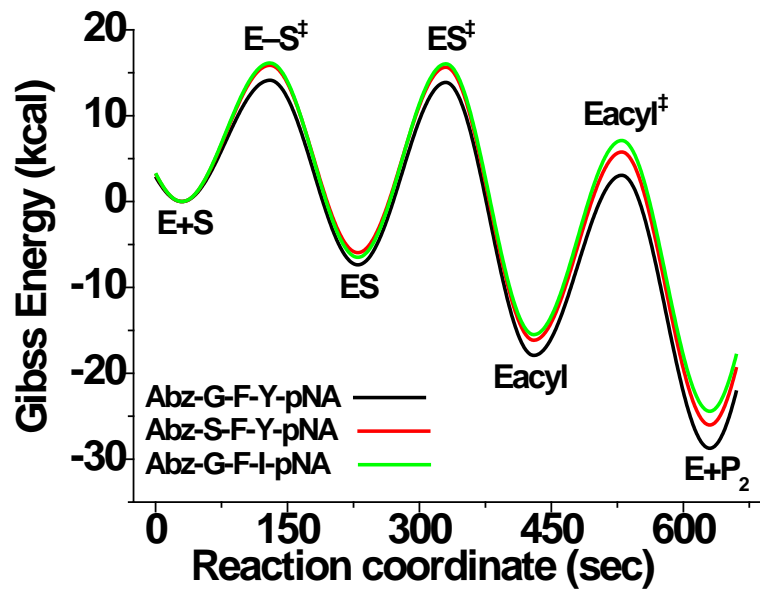
**Διάγραμμα 3.19:** Εξάρτηση των  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος **Abz-SFY-pNA** από την MPR). Υπολογίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι  $\Delta S_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = -151.60 \pm 2.10 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\Delta H_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = 32.51 \pm 0.58 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{k_{cat}/K_m}^\ddagger = 78.47 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , καθώς και οι  $\Delta S_{k_{cat}}^\ddagger = -241.33 \pm 2.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\Delta H_{k_{cat}}^\ddagger = 18.70 \pm 0.42 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{k_{cat}}^\ddagger = 93.07 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

## Υπόστρωμα: Abz-GFI-pNA



**Διάγραμμα 3.20:** Εξάρτηση των  $k_{\text{cat}}/K_m$  και  $k_{\text{cat}}$  από την τιμή της απόλυτης θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση (1.10), καθώς και υπολογισμός θερμοδυναμικών παραμέτρων για τις αντίστοιχες μεταβατικές καταστάσεις (υδρόλυση του υποστρώματος **Abz-GFI-pNA** από την MPR) Υπολογίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι  $\Delta S_{k_{\text{cat}}/K_m}^\ddagger = 7.46 \pm 0.63$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>,  $\Delta H_{k_{\text{cat}}/K_m}^\ddagger = 79.21 \pm 1.99$  kJ mol<sup>-1</sup>,  $\Delta G_{k_{\text{cat}}/K_m}^\ddagger = 76.95$  kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, καθώς και οι  $\Delta S_{k_{\text{cat}}}^\ddagger = 123.97 \pm 2.09$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>,  $\Delta H_{k_{\text{cat}}}^\ddagger = 106.82 \pm 0.29$  kJ mol<sup>-1</sup>,  $\Delta G_{k_{\text{cat}}}^\ddagger = 69.24$  kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

Από την παραπάνω διαδικασία, δηλαδή τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διαγραμμάτων **3.15** - **3.20** κατασκευάστηκε το ενεργειακό διάγραμμα της αντίδρασης της MPR επί των τριών αυτών υποστρωμάτων (**Διάγραμμα 3.21**).



**Διάγραμμα 3.21:** Ενεργειακό διάγραμμα των επιμέρους σταδίων των αντιδράσεων υδρόλυσης των υποστρωμάτων (i) Abz-GFY-pNA, (ii) Abz-SFY-pNA και (iii) Abz-GFI-pNA από την MPR. Οι ενεργειακές διαφορές είναι εμφανείς. Οι καμπύλες σχεδιάστηκαν με χρήση των υπολογισθέντων τιμών των σταθερών ταχύτητας  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  και  $k_3$ , που υπολογίστηκαν για το ένζυμο αυτό από τα Διαγράμματα εξάρτησης των  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$  ως προς την απόλυτη θερμοκρασία και με την υπόθεση ότι η τιμή του προ-εκθετικού παράγοντα Arrhenius ισούται προς  $6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  για όλα τα στάδια.

Για τα δύο υποστρώματα Abz-GFY-pNA και Abz-SFY-pNA, τα διαγράμματα της εξάρτησης της  $k_{cat}$  ως προς την θερμοκρασία, βρέθηκαν να είναι ελαφρά μετατοπισμένα προς υψηλότερες θερμοκρασίες και άρα οι πορείες που σχετίζονται με την απομάκρυνση του υποστρώματος από το ένζυμο, υπερισχύουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ το αντίθετο βρέθηκε για το υπόστρωμα Abz-GFI-pNA (**Διαγράμματα 3.15 - 3.17**).

Ωστόσο και για τα τρία υποστρώματα φαίνεται ότι ισχύουν οι σχέσεις  $k_{cat}/K_m \neq k_1$ , και  $k_{cat}/K_m = k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)$ , δηλαδή η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  είναι σύνθετη και αναφέρεται σε όλα τα στάδια από την αρχή της ενζυμικής αντίδρασης ως την ακυλίωση του ενζύμου. Στην περίπτωση του υποστρώματος Abz-GFI-pNA υπολογίστικαν περίπου ίσες τιμές των  $k_2$  και  $k_3$ , ένα γεγονός που οδηγεί στην σχέση  $k_{cat} \approx k_2/2 \approx k_3/2$  και επομένως δεν είναι

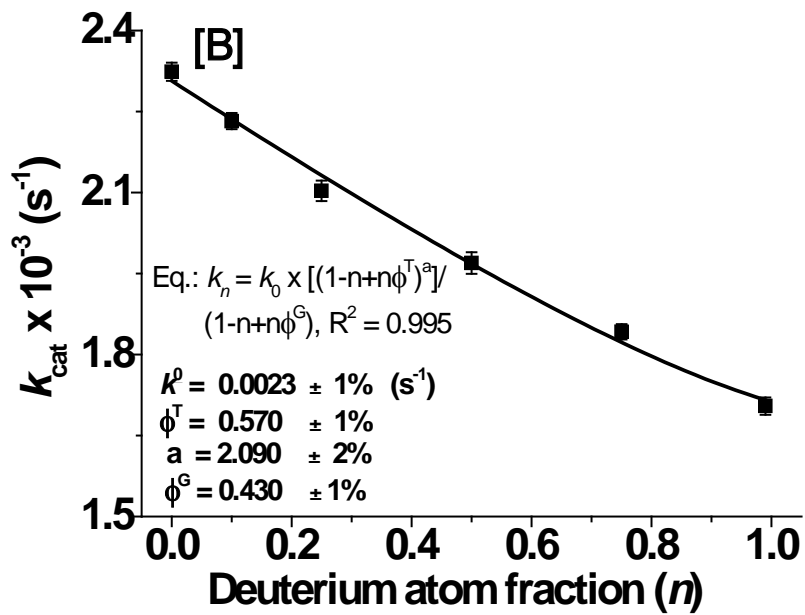
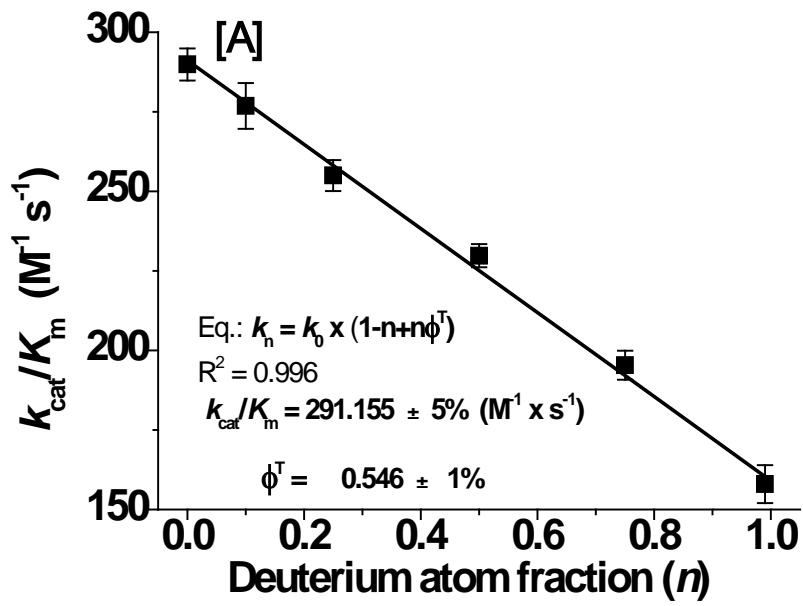
δυνατό να περιγραφεί μέχρι ποιο στάδιο αναφέρεται η  $k_{cat}$  μετά το ES (αν δηλαδή αναφέρεται και στην απακυλίωση). Άλλωστε, γι' αυτό το υπόστρωμα υπολογίστηκε μικρή θετική τιμή της  $\Delta S^\ddagger$ . Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις (και για τα τρία υποστρώματα) οι λόγοι  $k_2/k_3$  βρέθηκαν σχετικά μικροί σε μέγεθος. Όσον αφορά τα διαγράμματα  $T \times \ln[(k_{cat}/K_m)/T] = f(T)$  ισχύουν όμοια με εκείνα που έχουν περιγραφεί για το ένζυμο PPE.

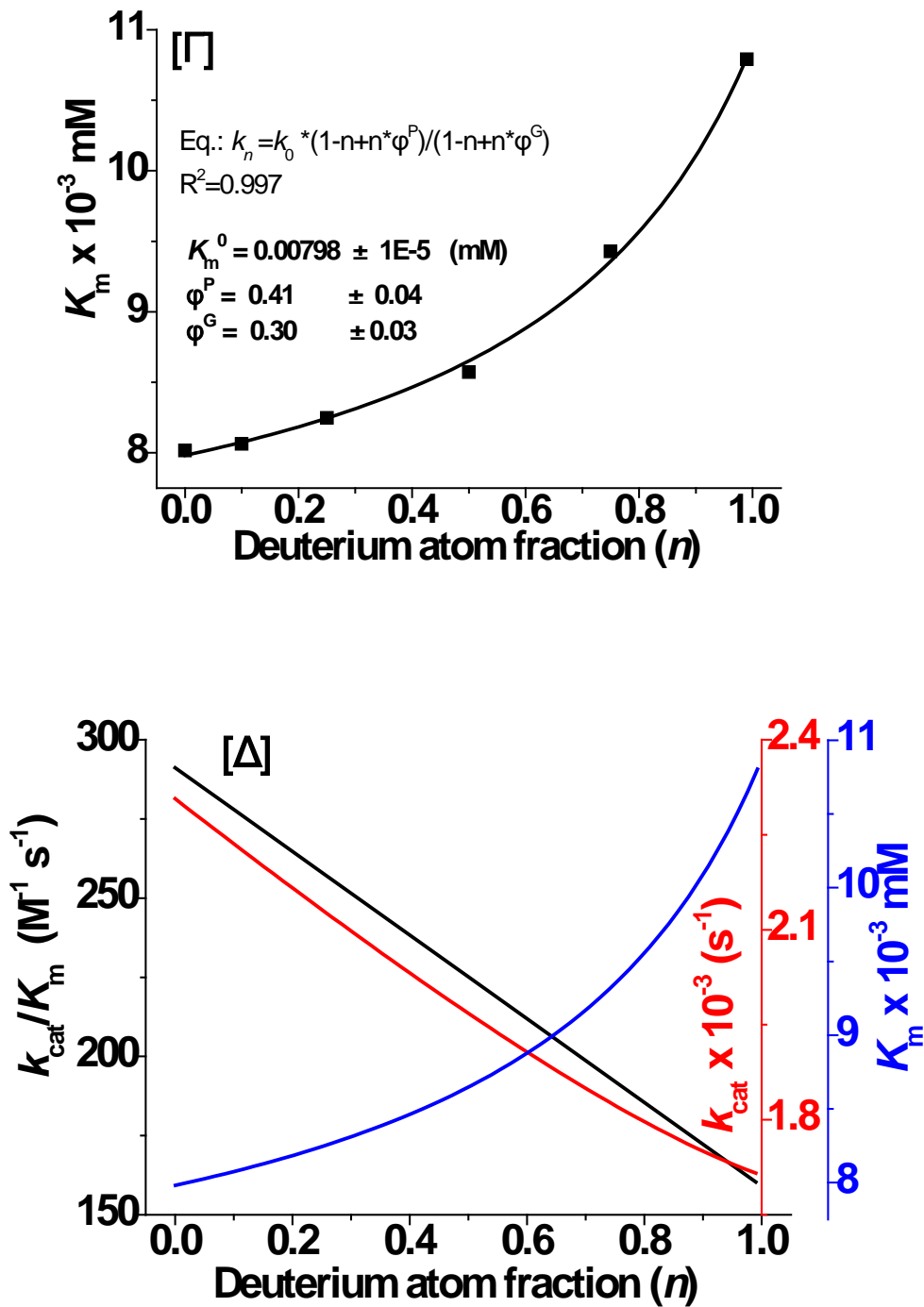
Με βάση τα αμέσως παραπάνω και τις τιμές των παραμέτρων και σταθερών ταχύτητας που υπολογίστηκαν, φαίνονται ως ορθά τα ενεργειακά διαγράμματα των τριών υποστρωμάτων (**Διάγραμμα 3.21**).

### **3B.8 Η εξάρτηση των παραμέτρων $k_{cat}/K_m$ , $k_{cat}$ και $K_m$ της MPR ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης**

Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge (GBK) [(εξίσωση 2.1)] προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα ( $n$ ,  $k_{cat}/K_m$ ), ( $n$ ,  $k_{cat}$ ) και ( $n$ ,  $K_m$ ) που προέκυψαν από τις κινητικές μετρήσεις της MPR επί του υποστρώματος Abz-GFY-pNA ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου ( $n$ ) του διαλύματος της αντίδρασης. Η διαδικασία της προσαρμογής πραγματοποιήθηκε σταδιακά<sup>176,199</sup>. Ειδικά για την περίπτωση της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$  η εξίσωση [ $k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)$ ] προσάρμοσε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα, για την  $k_{cat}$  η αντίστοιχη εξίσωση ήταν η [ $k_n = k_0 (1-n+n\phi^T)^a/(1-n+n\phi^G)$ ], ενώ για την περίπτωση της  $K_m$  τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στην εξίσωση [ $K_n = K_0 (1-n+n\phi^P)/(1-n+n\phi^G)$ ]. Στο **Διάγραμμα 3.22** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη προσαρμογή των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης **GBK** στα δεδομένα για το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA. Οι παράμετροι των εξισώσεων **GBK** υπολογίστηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.







**Διάγραμμα 3.22:** Γραφική παραστάση των συναρτήσεων: **A** [ $k_{cat}/K_m=f(n)$ ], **B** [ $k_{cat}=f(n)$ ] και **Γ** [ $K_m=f(n)$ ] για την υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-ρNA από την MPR και υπολογισμός σημαντικών παραμέτρων και **Δ** συγκριτική αναπαράσταση των **A** - **Γ**.

Θα πρέπει να τονιστεί και πάλι ότι για τα παραπάνω διαγράμματα, τα οποία περιγράφουν τις εξαρτήσεις των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $K_m$  της

MPR, ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου, του μέσου της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA, λόγω των κινητικών του χαρακτηριστικών που υπερισχύουν των δύο υπολοίπων υποστρωμάτων.

Για την περίπτωση της παραμέτρου  $k_{cat}/K_m$ :

(α) Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο στην μεταβατική κατάσταση, ενώ τιμή του παράγοντα κλασμάτωσης  $\phi^T = 0.55$  πιθανότατα αντιστοιχεί σε πρωτονικές γέφυρες κατάλυσης με ενυδάτωση ( $\phi^T$  από 0.3 - 0.6), δηλαδή οφείλεται σε μεταφορές πρωτονίων στις μεταβατικές καταστάσεις (από δονήσεις που είναι κάθετες προς την κατεύθυνση της αντίδρασης), μεταξύ ατόμων **O**, **N** και **S**, και σπάνια μπορεί να αντιστοιχεί, επίσης, σε δεσμούς υδρογόνου από μοριακές οντότητες του τύπου **LO<sup>-</sup>**, οι οποίοι είναι ισχυρότεροι στην μεταβατική κατάσταση από ότι στην θεμελιώδη

Για την περίπτωση της παραμέτρου  $k_{cat}$ :

(α) Μεταφέρονται δύο πρωτόνια στην μεταβατική κατάσταση με τιμή παράγοντα κλασμάτωσης  $\phi^T = 0.57$ , που πιθανότατα αντιστοιχούν σε πρωτονικές γέφυρες μεταξύ καρβοξυλομάδας και ομάδας αλκοόλης (**-COO<sup>-</sup>...H...OR**), για  $\phi^T$  από 0.51 - 0.56), είτε και σε πρωτονικές γέφυρες κατάλυσης με ενυδάτωση ( $\phi^T$  από 0.3 - 0.6), δηλαδή οφείλεται σε μεταφορές πρωτονίων στις μεταβατικές καταστάσεις (από δονήσεις που είναι κάθετες προς την κατεύθυνση της αντίδρασης), μεταξύ ατόμων **O**, **N** και **S**, είτε και σε πρωτονικές γέφυρες μεταξύ καρβοξυλομάδας και ομάδας αμίνης (**-COO<sup>-</sup>...H...>NR**), για  $\phi^T \sim 0.45$ )

(β) Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο στην θεμελιώδη κατάσταση με τιμή παράγοντα κλασμάτωσης  $\phi^G = 0.43$ , που πιθανότατα αντιστοιχεί σε πρωτονικές γέφυρες κατάλυσης με ενυδάτωση ( $\phi^G$  από 0.3 - 0.6), δηλαδή οφείλεται σε μεταφορές πρωτονίων στις θεμελιώδεις καταστάσεις (από δονήσεις που είναι κάθετες προς την κατεύθυνση της αντίδρασης), μεταξύ ατόμων **O**, **N** και **S**.

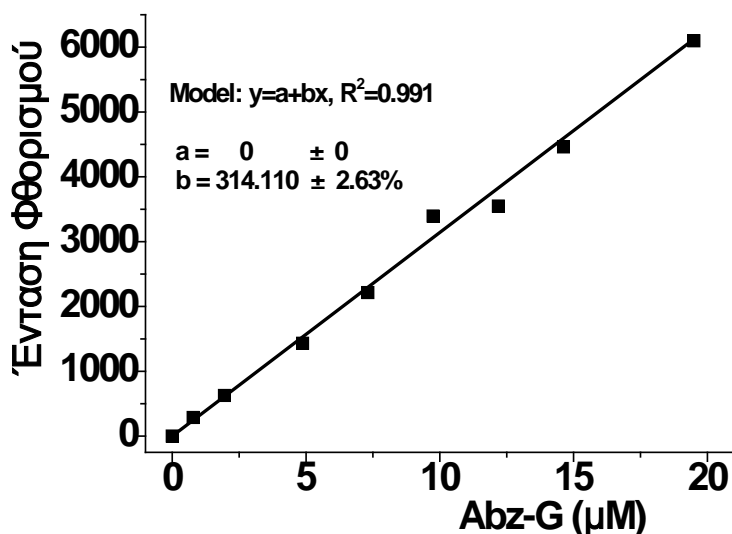
Για την περίπτωση της παραμέτρου  $K_m$ :

(α) Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο στην κατάσταση προϊόντος και ένα στην θεμελιώδη κατάσταση, με τιμές παραγόντων κλασμάτωσης  $\phi^P = 0.41$  και  $\phi^G = 0.30$ , αντίστοιχα. Η παραμέτρος  $K_m$  η οποία γενικά αποτελεί μέτρο της [S] που απαιτείται για να υπάρξει σημαντική καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου και για μηχανισμούς όπως αυτός του **Σχήματος 3.1** (των πολλαπλών σταδίων) δίνεται από την σχέση  $K_m := k_3/(k_{-1}+k_2)/[k_1(k_2+k_3)]$ , είναι μία πολύπλοκη σταθερά αν, όπως στην περίπτωση που εξετάζουμε, δεν ισχύουν σχέσεις  $k_{-1} \ll k_2$  ή αντίστροφα είτε και  $k_2 \ll k_3$  ή αντίστροφα. Έτσι, οι υπολογιζόμενοι παράγοντες κλασμάτωσης αντιστοιχούν πιθανότατα σε σε υδρογονικές θέσεις είτε και σε γέφυρες νερού για μεταφορά πρωτονίων χωρίς φαινόμενα σύραγγας ή πολύ σπάνια σε ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου κατά την αντίδραση  $E + S \xleftarrow{K_m} ES$  <sup>175</sup>.

### 3B.9 Ανάπτυξη νέας μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή

#### 3B.9.1 Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή

Στην ενότητα 2B.9.1 περιγράφηκε η μεθοδολογία προσδιορισμού δραστηριότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή με την χρήση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA, η οποία βασίζεται στην μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) κατά την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού. Το αποτέλεσμα εξάγεται από πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με την χρήση σειράς διαλυμάτων της φθορίζουσας χημικής ένωσης Abz-G, όμοια κατεργασμένων και την εξίσωση  $X_{[S]} \text{ σε } \mu\text{M} = Y_{(\text{φθορισμός})}/314.11$ , που προέκυψε από προσαρμογή των αντίστοιχων δεδομένων σε ευθεία γραμμή (**Διάγραμμα 3.23**).



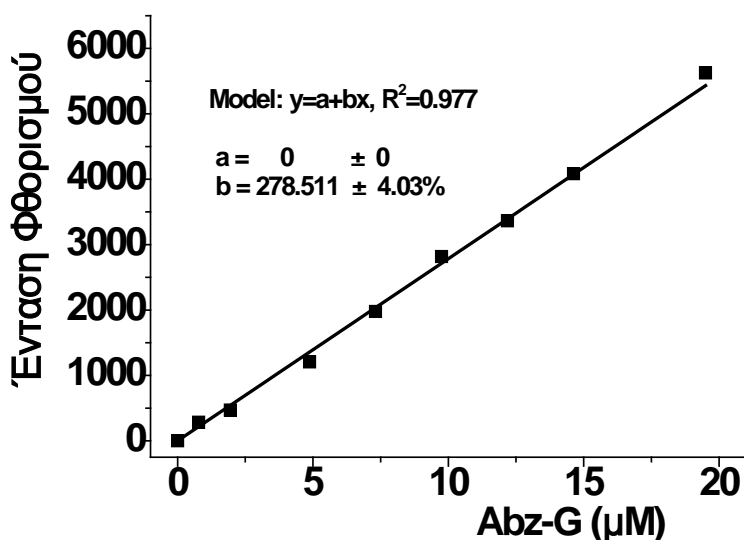
**Διάγραμμα 3.23:** Πρότυπη καμπύλη Abz-G για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατά την μέτρηση της δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή.

Όπως φαίνεται από την πρότυπη καμπύλη (ένθετος πίνακας), οι μετρήσεις δίνουν υψηλή γραμμικότητα (< 99%), ενώ τα όρια ανίχνευσης φθορισμού εκτείνονται από πολύ χαμηλές (<100) ως πάρα πολύ υψηλές (6000>) τιμές φθορισμού. Υπό τις συνθήκες αυτές, ως **1 I.U. της MPR**, ορίζονται τα μολ του υποστρώματος Abz-GFY-pNA που υδρολύονται σε ένα λεπτό (μmol/min). Έτσι υπολογίστηκε ότι 0.01743 I.U. αντιστοιχούν ανά 10 μL του ενζυμικού διαλύματος (διαθέσιμο παρασκεύασμα MPR 25 μM), που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις της παρούσας εργασίας. Η προηγούμενη μέτρηση δραστικότητας επαναλήφθηκε δέκα (10) φορές και τα αποτελέσματα των υπολογιζόμενων I.U. δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (τ.α. < 3 %).

### 3B.9.2.α Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστικότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή

Σε αντιστοιχία με την μεθοδολογία προσδιορισμού δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή, στην ενότητα 2B.9.2.α περιγράφηκε η μεθοδολογία προσδιορισμού δραστικότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή

χρησιμοποιώντας τους βιοκαταλύτες B1-B4. Τα αποτελέσματα εξάγονται από πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με την χρήση σειράς διαλυμάτων της φθορίζουσας χημικής ένωσης Abz-G, όμοια κατεργασμένων και την εξίσωση  $X_{[S]} \text{ σε } \mu\text{M} = Y_{(\text{Φθορισμός})}/278.511$ , που προέκυψε από προσαρμογή των αντίστοιχων δεδομένων σε ευθεία γραμμή (Διάγραμμα 3.24).



**Διάγραμμα 3.24:** Πρότυπη καμπύλη Abz-G για την μετατροπή της έντασης του φθορισμού σε συγκέντρωση κατά την μέτρηση της δραστηριότητας των παρασκευασμάτων της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή.

Από την πρότυπη καμπύλη (ένθετος πίνακας) συνεπάγεται ότι οι μετρήσεις δίνουν υψηλή γραμμικότητα (< 98%), ενώ τα όρια ανίχνευσης φθορισμού εκτείνονται από πολύ χαμηλές (<100) ως πάρα πολύ υψηλές (6000>) τιμές φθορισμού. Έτσι, ως **1 I.U. της ακινητοποιημένης MPR**, ορίζονται τα μολ του υποστρώματος Abz-GFY-pNA που υδρολύονται σε ένα λεπτό (μmol/min) και υπολογίστηκε ότι:

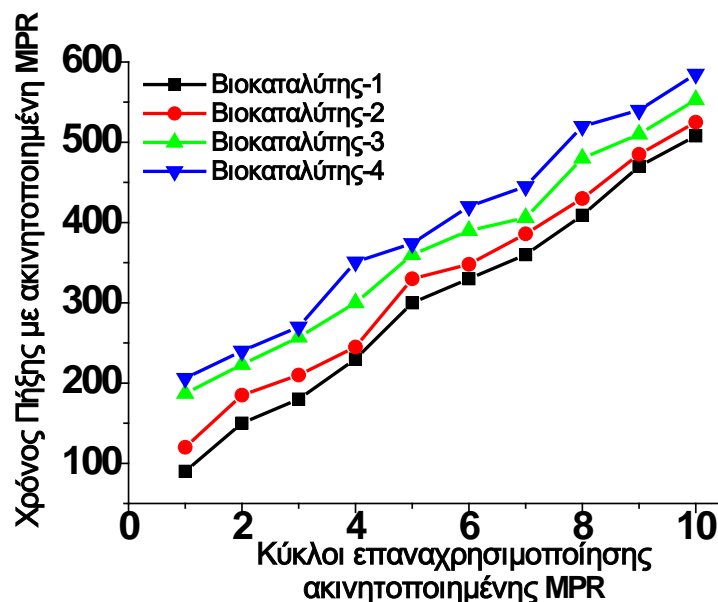
- ✚ 0.11480 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-1
- ✚ 0.10824 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-2
- ✚ 0.09359 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-3 και
- ✚ 0.08944 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-4.

Οι μετρήσεις αυτές επαναλήφθηκαν δέκα (10) φορές και οι υπολογιζόμενες I.U. δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (τ.α. < 3 %).

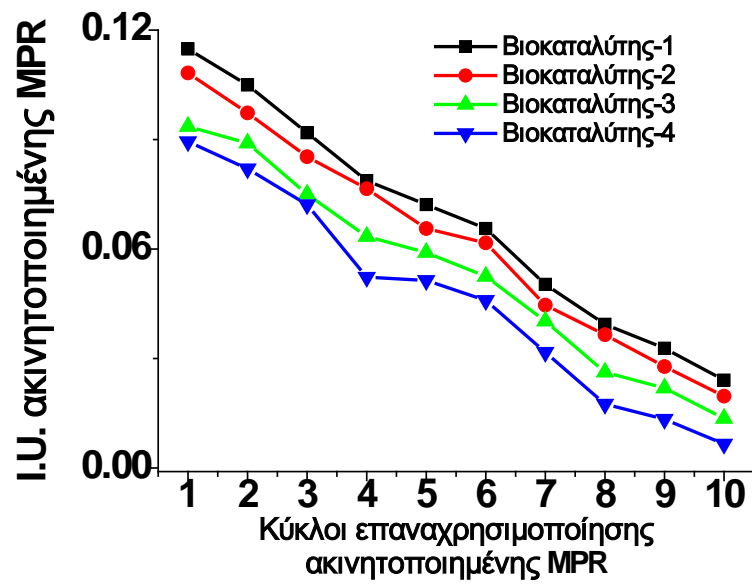
### 3B.9.2.β Συσχέτιση της προσδιοριζόμενης δραστικότητας της ακινητοποιημένης MPR και της ικανότητας πήξης γάλακτος

Οι βιοκαταλύτες ακινητοποιημένης MPR (B1-B4) χρησιμοποιήθηκαν για επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις ώστε να εξεταστεί ο χρόνος πήξης του γάλακτος και ως εκ τούτου η σταθερότητά τους. Παράλληλα, σε κάθε κύκλο ζυμώσεων προσδιορίστηκαν και τα αντίστοιχα I.U. του κάθε βιοκαταλύτη για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των προσδιοριζόμενων I.U. και του χρόνου πήξης του γάλακτος. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στα **Διαγράμματα 3.25** και **3.26**, οι 4 βιοκαταλύτες παρέμειναν ενεργοί για 10 επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των προσδιοριζόμενων I.U. και του χρόνου πήξης του γάλακτος (μείωση των I.U. με ανάλογη αύξηση του αντίστοιχου χρόνου πήξης του γάλακτος).

Έτσι, εκπληρώνεται το ζητούμενο της ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού της δραστικότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή με προοπτική την εφαρμογή της σε βιοκαταλυτικές διαδικασίες παραγωγής τυριού σε βιομηχανική κλίμακα.



**Διάγραμμα 3.25:** Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών MPR (B1-B4) με βάση τον χρόνο πήξης του γάλακτος



**Διάγραμμα 3.26:** Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών MPR (B1-B4) με βάση την τιμή των προσδιοριζόμενων I.U.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



#### 4.A. Διερεύνηση του μηχανισμού αντιστρεπτής αναστολής της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PPE) από TFA-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια

Ένα από τα αντικείμενα μελέτης της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του μηχανισμού της αντιστρεπτής αναστολής της PPE (παγκρεατική ελαστάση από χοίρο), από TFA-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια, που έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αντιστρεπτοί αναστολείς διάφορων τύπων ελαστάσης. Η PPE είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο και χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τις ανθρώπινες ελαστάσες. Η εύρεση του τρόπου πρόσδεσης και του μηχανισμού δράσης των αναστολέων αυτών επί της PPE θα μπορούσε και να συνεισφέρει στον μελλοντικό σχεδιασμό παραγώγων-αναστολέων κατά της παθογένεσης του εμφυσήματος κι άλλων ασθενειών και σε συναφείς εφαρμογές, αλλά κυρίως να χρησιμεύσει ως βάση για την μελέτη της πρόσδεσης και της καταλυτικής αποτελεσματικότητας υποστρωμάτων άλλων πρωτεασών.

Σε αυτή την εργασία διερευνήθηκε ο μηχανισμός της αντιστρεπτής αναστολής της PPE με τρεις εξειδικευμένους αντιστρεπτούς αναστολείς της γενικής μορφής  $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-XA-NHPh-}p\text{-CF}_3$ , όπου  $\text{X}=\{\text{D, K, V}\}$  και με εφαρμογή των εξής μεθοδολογιών: (α) προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων της PPE με τους τρεις αντιστρεπτούς αναστολείς και με χρήση τεχνικών υπολογιστικής προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής, (β) κινητική μελέτη της δράσης της PPE επί του υποστρώματος Suc-AAA-pNA (μελέτη των παραμέτρων Michaelis-Menten) και (γ) κινητική μελέτη της αναστολής της PPE, από τους τρεις παραπάνω αναστολείς, περιλαμβάνοντας διαγράμματα των τιμών pH και απόλυτης θερμοκρασίας, καθώς και εφαρμογή της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων (μελέτη των παραμέτρων  $K_i$  και  $K_i = 1/K_i$ ), αλλά και υπολογισμό σημαντικών σταθερών ταχύτητας και θερμοδυναμικών σταθερών.

Από τα υπολογιστικά και πειραματικά αποτελέσματα των προαναφερθέντων προκύπτει επαγωγικά ότι τα πιο αποφασιστικά σημεία είναι τα εξής: Απουσία των ανταγωνιστικών αναστολέων TFA-διπεπτιδικών-π-τριφθορο-ανιλιδίων, η PPE ξεκινά την καταλυτική υδρόλυση του Suc-AAA-pNA μέσω μιας εικονικής μεταβατικής κατάστασης (virtual transition state), η

οποία αποδίδεται σε διαμορφωτικές αλλαγές στην πορεία προς το σύμπλοκο ES και περιλαμβάνει δύο ανταγωνιστικά στάδια, ένα φυσικό με μικρότερη συμμετοχή ( $C_{Ph} = 0.30$ ) κι ένα χημικό με μεγαλύτερη συμμετοχή ( $C_{Ch} = 0.70$ ). Και τα δύο προαναφερθέντα στάδια συνεισφέρουν στον σχηματισμό ενός μη-ομοιοπολικού συμπλόκου ( $ES^{\ddagger}$ ) και στην επαγόμενη παραγωγή του προϊόντος  $P_1$  (αμινο-υπόλοιπο).

Δύο σταθεροποιημένες καταστάσεις αντιδρώντων, οι οποίες διέπονται από τις παραμέτρους  $1/K_m$  και  $k_{cat}$  αντίστοιχα, προηγούνται του ακυλο-

ενζύμου (κυρίαρχο ενζυμικό είδος). Ο αναστολέας-1 ( $CF_3-C(=O)-KA-NH-C_6H_4-CF_3$ ), ο

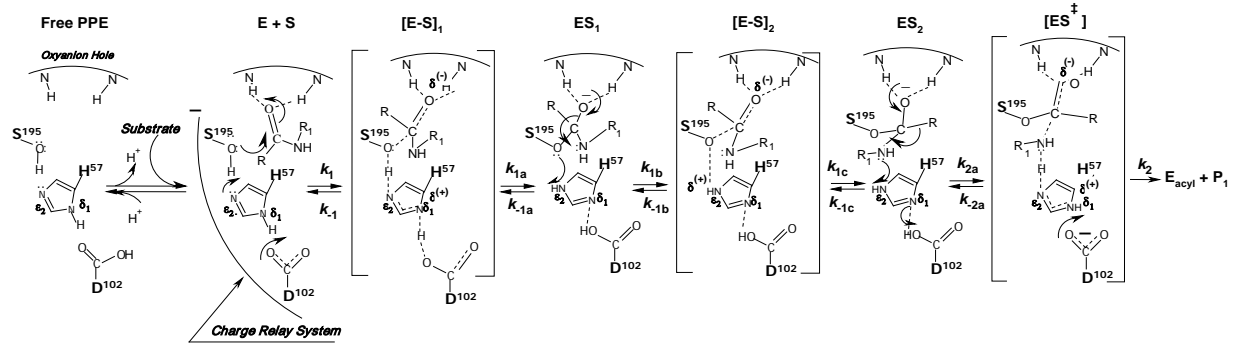
οποίος παρουσίασε την καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης, όπως προέκυψε από τις υπολογιστικές προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για να απεικονίσει τις βασικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούν μια υψηλότερη σταθεροποίηση του συμπλόκου PPE-αναστολέα. Η κατάταξη του αναστολέα-1 ως βέλτιστου επαληθεύτηκε και από το μεγαλύτερο εύρος της καμπύλης του διαγράμματος της παραμέτρου  $1/K_i$  ως προς την τιμή pH (που αντιστοιχεί σε αυτόν, σε σύγκριση με τα διαγράμματα της ίδιας παραμέτρου για τους υπόλοιπους δύο αναστολείς) ενισχύοντας ταυτόχρονα και την σημασία των  $S_2-P_2$  αλληλεπιδράσεων και την προτίμηση σε θετικά φορτισμένες ομάδες.

Επιπροσθέτως, όπως προέκυψε από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, οι τιμές RMSD τόσο της PPE όσο και του αναστολέα-1 είναι σε πλήρη συμφωνία, υποδεικνύοντας ότι ο αναστολέας διατηρεί τον αρχικό τρόπο πρόσδεσής του κατά τη διάρκεια των 5 ns της προσομοίωσης. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου PPE-αναστολέα που βρέθηκε να διατηρούνται κατά την διάρκεια της προσομοίωσης είναι οι ακόλουθες: (i) επτά δεσμοί υδρογόνου ( $V^{99}$ ,  $D^{102}$ ,  $2x G^{192}$ ,  $S^{214}$ , and  $2x V^{216}$ ), (ii) οκτώ γέφυρες  $H_2O$  ( $T^{96}$ ,  $2x V^{99}$ ,  $2x G^{192}$ ,  $2x S^{214}$ , and  $R^{217A}$ ) και (iii) δύο αλληλεπιδράσεις  $\pi$ -κατιόντος ( $H^{57}$ , and  $R^{217A}$ ).

Οι παρατηρούμενες τιμές των παραγόντων κλασμάτωσης  $\phi^{\ddagger}$ , που μειώνονται εκθετικά, για τις καταμετρήσεις πρωτονίων στην περίπτωση της παράμετρου  $k_{cat}/K_m$  και παρουσία των αντιστρεπτών αναστολέων, μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι οι σχηματιζόμενες γέφυρες ύδατος

(συμπεριλαμβάνονται όλα τα πιθανά είδη  $H_2O/D_2O$  - δεσμοί υδρογόνου πιο ισχυροί στην μεταβατική κατάσταση), μεταβάλλουν σταδιακά τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων  $H^{57}$  και  $D^{102}$ . Αυτές οι μεταβολές εξαρτώνται από την συγκέντρωση του εκάστοτε αναστολέα ενώ δεν παρατηρούνται φαινόμενα σήραγγος. Οι υπολογιζόμενες αρνητικές συνεργατικότητες για τους εκθέτες  $\mu$ , αλλά και οι τιμές του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη (S.I.E.) ερμηνεύονται ως ένδειξη διαμορφώσεων υψηλής συγγένειας του ενζύμου στην πρώτη περίπτωση και σε μειωμένη αποτελεσματικότητα του τρόπου πρόσδεσης ενζύμου-αναστολέα στην δεύτερη περίπτωση. Ένα άλλο σημαντικό και αποφασιστικό σημείο που θα πρέπει να τονιστεί είναι ότι όλοι οι χρησιμοποιηθέντες αντιστρεπτοί ανταγωνιστικοί αναστολείς (TFA-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια) επωάστηκαν με την PPE και δεσμεύτηκαν σε αυτήν πριν από την προσθήκη του υποστρώματος, με το σύστημα να φτάνει σε ισορροπία και να δημιουργείται ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Ακολουθούσε η προσθήκη του υποστρώματος στο μίγμα της αντίδρασης, του οποίου η υδρόλυση προχωρούσε με την αποκατάσταση μιας νέας ισορροπίας όπου ο σχηματισμός και των δύο συμπλοκών  $ES$  και  $ES^\ddagger$  επιτυγχάνεται από ένα δομικά διαταραγμένο και πιο άκαμπτο μόριο της PPE. Δεν υπήρξαν περαιτέρω πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν είτε την ύπαρξη μιας εικονικής μεταβατικής κατάστασης είτε ενός φυσικού σταδίου.

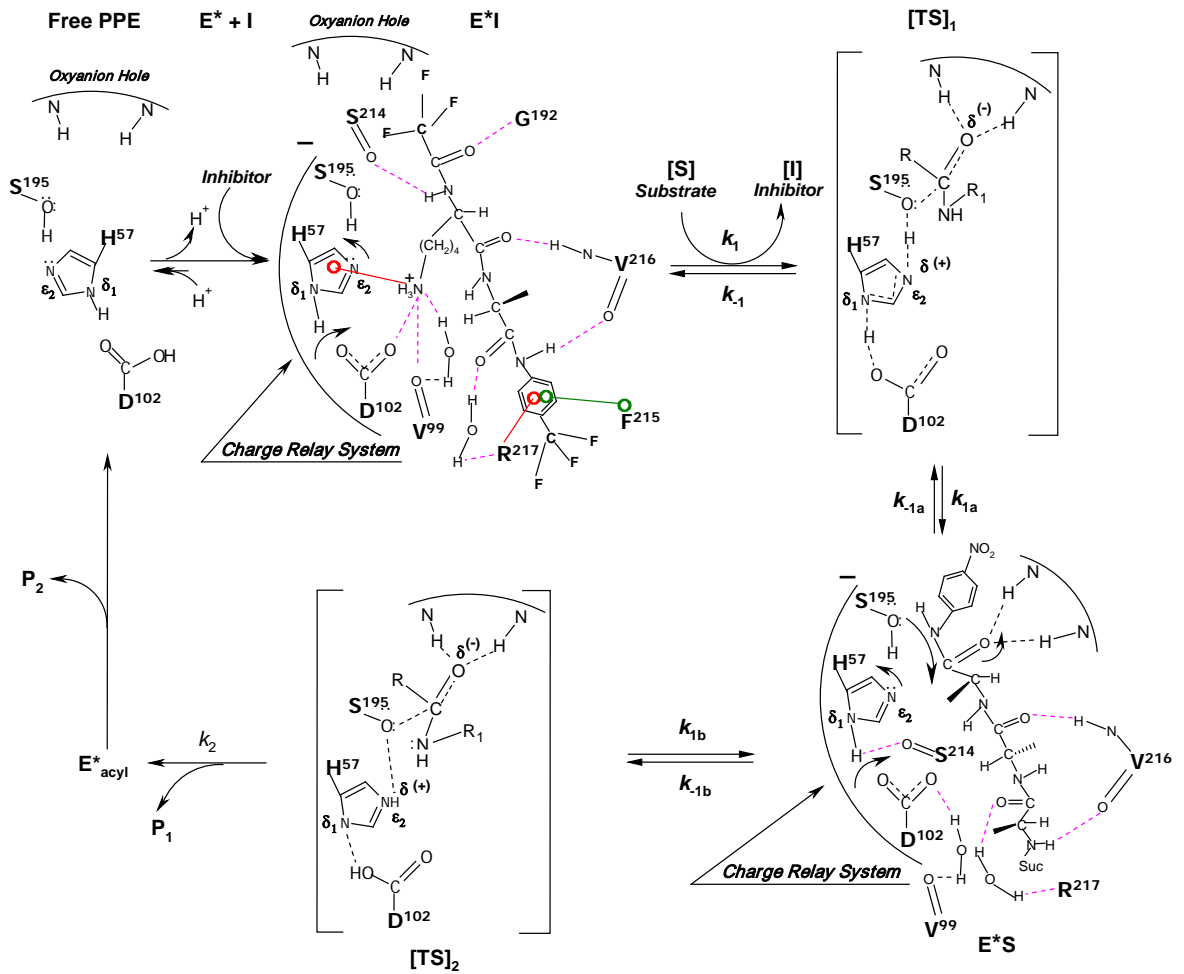
Στο **Σχήμα 4.1** παρουσιάζεται ο μηχανισμός ακυλίωσης της PPE όπου απεικονίζεται η εικονική μεταβατική κατάσταση (virtual transition state) και περιλαμβάνει τις δύο μεμονωμένες μεταβατικές καταστάσεις  $[ES]_2$  and  $[ES]^\ddagger$  καθώς και το τετραεδρικό ενδιάμεσο  $ES_2$ , δηλαδή το ισοδύναμο του  $TS_2$  του σχήματος της αντίδρασης 3.1. Στην περίπτωση αυτή, το φυσικό στάδιο συμβολίζεται από την ονομαζόμενη αντιστροφή/περιστροφή αζώτου (nitrogen inversion/rotation) περί τον πρώην αμιδικό δεσμό, ο οποίος έχει ήδη χάσει τον χαρακτήρα διπλού δεσμού στα τετραεδρικά ενδιάμεσα  $ES_1$  and  $ES_2$  πριν την πλήρη διάσπασή του<sup>207-208</sup>.



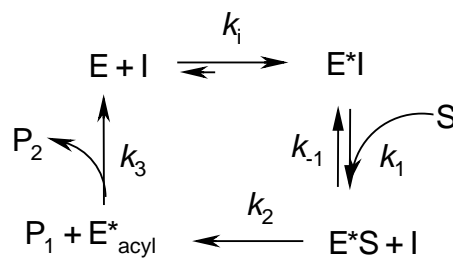
**Σχήμα 4.1:** Μηχανισμός ακυλίωσης της PPE ως τον σχηματισμό του ακυλ-ενζύμου ( $E_{acyl}$ ) κατά την διάρκεια υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-AAA-pNA διαμέσου του "συμπλόκου μεταφοράς φορτίου (Charge Relay System).

Με βάση τα προαναφερθέντα συμπεράσματα προκύπτει ο πιθανός μηχανισμός της αντιστρεπτής αναστολής της PPE από τους αναστολείς TFA-διπεπτιδικά-π-τριφθορο-ανιλίδια (αναφέρεται ως παράδειγμα ο μηχανισμός με τον αναστολέα  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ ), που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.2** και κατά τον οποίο το σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου σχηματίζεται, καταστρέφεται και ανασχηματίζεται μόλις πριν τον σχηματισμό του πρώτου προϊόντος (της αμίνης).

(α)



(β)



**Σχήμα 4.2:** (α) Πιθανός μηχανισμός αντιστρεπτής αναστολής της PPE (αναστολέας:  $CF_3C(O)-KA-NHPh-p-CF_3$ ; υπόστρωμα: Suc-AAA-pNA), (β) εννοιολογική σύντομη εκδοχή του μηχανισμού αντιστρεπτής αναστολής της PPE.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 4.2.α**, η αναστολή ξεκινά με την αντίδραση του ελεύθερου ενζύμου και του αναστολέα προς το σχηματισμό του συμπλόκου

$E^*$ I, που οδηγεί σε μια πιο άκαμπτη διαμόρφωση του μορίου της PPE λόγω της σύνδεσης του αναστολέα σε αυτό. Έτσι κατά την υδρόλυση του υποστρώματος παρουσία του αναστολέα από την PPE (τροποποιημένη δομή) δεν παρατηρείται ο σχηματισμός της εικονικής μεταβατικής κατάστασης (virtual transition state). Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ο αντιστρεπτός χαρακτήρας της αντίδρασης μεταξύ του ελεύθερου ενζύμου και του αναστολέα προς το σχηματισμό του συμπλόκου  $E^*$ I, όσο και ότι κατά την αντίδραση του τροποποιημένου μορίου της PPE με το υπόστρωμα στην πορεία προς την ακυλίωση δεν φαίνεται να πραγματοποιείται η αντιστροφή/περιστροφή αζώτου<sup>208,209</sup>. Αμέσως μετά ακολουθεί ο σχηματισμός του αντίστοιχου ακυλ-ενζύμου κι η επακόλουθη μετατροπή του σε ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα.

#### 4.B. Ρεννίνη (MPR) από το μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus*:

(i) Σχεδιασμός και σύνθεση νέων πεπτιδικών υποστρωμάτων για την μέτρηση της δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη κι ακινητοποιημένη μορφή

(ii) Αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης και εύρεση του πιθανού μηχανισμού δράσης της MPR επί του υποστρώματος Abz-GFY-pNA

Ένα ακόμη αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ρεννίνη (MPR) από το μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus*, μία ασπαρτικοπρωτεΐνωση η οποία έχει χαρακτηριστεί ως ένα πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο της βόοειας χυμοσίνης, λόγω των εξαιρετικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Στόχος ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων υποστρωμάτων με στόχο: (α) την ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού της δραστικότητας του ενζύμου αυτού και κατ' επέκταση (β) την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του, δύο προαπαιτούμενα για την ευρεία χρήση της MPR στην παραγωγή τυριού σε βιομηχανική κλίμακα και σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Αναλυτικότερα, σχεδιάστηκαν υποστρώματα της γενικής μορφής Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-pNA, Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-pNA και Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>-pNA, όπου στις θέσεις X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> δοκιμάστηκαν συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων, όπως αυτά προέκυψαν τόσο από την μελέτη των υποπεριοχών πρόσδεσης υποστρώματος, όσο και από μελέτη του καταλυτικού κέντρου της MPR, καθώς επίσης και άλλων ασπαρτικοπρωτεϊνών. Αυτού του είδους τα υποστρώματα (FRET-πεπτίδια) αποτελούν εξαιρετικά εργαλεία για ενζυμικές κινητικές μελέτες και για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας καθώς η μέθοδος της φθορισμομετρίας (FRET) είναι γρήγορη, εξαιρετικά ευαίσθητη και αξιόπιστη.

Από τις *in silico* μελέτες της ικανότητας και του τρόπου πρόσδεσης των μορίων αυτών στην ενεργό περιοχή της MPR, προέκυψε ότι υποστρώματα της γενικής μορφής Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-pNA και συγκεκριμένα τα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, εμφάνισαν ευνοϊκότερους όρους πρόσδεσης σε σχέση με τα υποστρώματα της γενικής μορφής Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-pNA και Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>-pNA. Εξαίρεση αποτέλεσε το υποστρώμα Abz-GNSFY-pNA (Abz-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>-pNA), για το οποίο υπολογίστηκε μια εξαιρετικά υψηλή



αρνητική ενέργεια πρόσδεσης η οποία αποδίδεται προφανώς στον αυξημένο αριθμό καταλοίπων που οδηγεί σε εκτεταμένες επαφές με κατάλοιπα της ενεργού περιοχής της MPR σε σχέση με τα υπόστρωμα της γενικής μορφής Abz- $X_1X_2X_3$ -pNA. Η άποψη αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων μεταδυναμικής (ενότητα 3B.3) όπου φαίνεται ότι οι αποστάσεις για αποτελεσματική κατάλυση CV1 (~3.8 Å) και CV2 (~4.8 Å) ήταν αρκετά μεγάλες και επαληθεύεται από το γεγονός ότι το υπόστρωμα αυτό δεν επέδειξε φθορισμό στο δεδομένο χρόνο αντίδρασης.

Όσον αφορά τον τρόπο πρόσδεσης των τεσσάρων αυτών υποψήφιων υποστρωμάτων στην ενεργό περιοχή της MPR, όπως προέκυψε από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής διάρκειας, 4ns συμπεραίνονται τα εξής:

- Το καταλυτικό  $D^{215}$  (MPR) δρα ως δέκτης μιας γέφυρας  $H_2O$ , αφού όπως παρατηρείται και για τα τέσσερα υποστρώματα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καταλυτικό μόριο  $H_2O$ , το οποίο με την σειρά του σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με συγκεκριμένα κατάλοιπα του εκάστοτε υποστρώματος. Να σημειωθεί ότι παρατηρείται διαφοροποίηση στην διάρκεια αυτού του είδους των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τεσσάρων υποστρωμάτων.
- Το καταλυτικό  $D^{32}$  (MPR) δρα αντίστοιχα ως δότης μιας γέφυρας  $H_2O$ , αφού σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με ένα δεύτερο μόριο  $H_2O$ , το οποίο με την σειρά του σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με συγκεκριμένα κατάλοιπα του εκάστοτε υποστρώματος.
- Ένας πολύ σημαντικός δεσμός υδρογόνου είναι αυτός που σχηματίζεται μεταξύ της  $G^{76}$  (MPR) και του καρβονυλικού οξυγόνου του κατάλοιπου  $F$  για τα υποστρώματα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA και με το καρβονυλικό οξυγόνο του κατάλοιπου  $Y$  για το υπόστρωμα Abz-GNSFY-pNA. Το κατάλοιπο  $G^{76}$  (MPR) πιθανά να λειτουργεί ως οπή οξυανιόντος, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην καταλυτική διαδικασία.
- Αξιοσημείωτες είναι και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται κατά την αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA με την MPR, οι οποίες συνεισφέρουν στην περεταίρω σταθεροποίηση των υποστρωμάτων

αυτών στην ενεργό περιοχή της MPR. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις δεν παρατηρούνται για το υπόστρωμα Abz-GNSFY-pNA.

Με την ολοκλήρωση της πεπτιδικής σύνθεσης ελήφθησαν φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αντίδραση της MPR επί των τεσσάρων αυτών FRET-παραγώγων για να διαπιστωθεί εάν τα παράγωγα αυτά συνιστούν υποστρώματα του ενζύμου αυτού. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι μόνο τρία παράγωγα και συγκεκριμένα τα παράγωγα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, παρουσίασαν φθορισμό με μέγιστο  $\lambda_{em} = 415$  nm και επομένως συνιστούν υποστρώματα της MPR. Το παράγωγο Abz-GNSFY-pNA δεν επέδειξε καθόλου φθορισμό στο δεδομένο χρόνο αντίδρασης, σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα προσομοιώσεων μεταδυναμικής κι έτσι δεν χρησιμοποιήθηκε σε περαιτέρω μελέτες.

Ακολούθησαν κινητικές μελέτες της MPR με τα υποστρώματα Abz-GFY-pNA, Abz-SFY-pNA και Abz-GFI-pNA, για την εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης και στατιστικά ισχυρής μεθόδου ενζυμικής δραστηριότητας. Η επιλογή στηρίχθηκε στην σύγκριση των τιμών των παραμέτρων Michaelis-Menten, των σταθερών ταχύτητας, αλλά και των αντίστοιχων θερμοδυναμικών παραμέτρων ενεργοποίησης, οι οποίες υπολογίστηκαν και φαίνονται στον **Πίνακα 4.1**, μαζί με τις υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων Michaelis-Menten.

Η παράμετρος  $k_{cat}/K_m$  για το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA υπολογίστηκε σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη των λοιπών δύο υποστρωμάτων υποστηρίζοντας την καλύτερη κατάταξή του ως δραστικότερου. Το προηγούμενο συμπέρασμα ενισχύεται και από τις υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων  $k_{cat}$  και  $K_m$  των τριών υποστρωμάτων, όπου είναι εξίσου εμφανείς οι μεγάλες διαφορές μεταξύ του υποστρώματος Abz-GFY-pNA και των δύο υπολοίπων και ως ισχυρότερα προσδεόμενο στο χρησιμοποιηθέν ένζυμο (6 και 3 φορές, αντίστοιχα), αλλά και ως ταχύτερα αντιδρών (3 και 13 φορές, αντίστοιχα).

**Πίνακας 4.1:** Υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων Michaelis-Menten, των σταθερών ταχύτητας και των αντίστοιχων θερμοδυναμικών παραμέτρων ενεργοποίησης, για τα τρία FRET-πεπτιδικά υποστρώματα

Υπόστρωμα	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_1$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$k_3$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta S^\ddagger$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )	$\Delta H^\ddagger$ ( $kJ K^{-1}$ )	$\Delta G^\ddagger$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )	
Abz-GFY-pNA	289.9	2.33E-3	8.0E-3	474.11	2.55E-3	3.85E-3	5.96E-3	-124	22.3	60	$k_{cat}/K_m$
								-152	43.2	90	$k_{cat}$
Abz-SFY-pNA	15.7	7.90E-4	5.10E-2	26.99	1.51E-3	2.18E-3	1.26E-3	-152	32.5	78	$k_{cat}/K_m$
								-241	18.7	93	$k_{cat}$
Abz-GFI-pNA	8.0	1.7E-4	2.13E-2	13.95	0.29E-3	0.34E-3	0.30E-3	8	79	77	$k_{cat}/K_m$
								-124	107	69	$k_{cat}$

Δεδομένου ότι το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA διαθέτει τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά όπως είναι η υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, η οποία βασίζεται στην μεταβολή της έντασης του φθορισμού ( $\lambda_{em} = 415$  nm,  $\lambda_{ex} = 340$  nm) κατά την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη μορφή, υπολογίστηκε ότι 0.01743 I.U. αντιστοιχούν ανά 10  $\mu$ L του ενζυμικού διαλύματος (διαθέσιμο παρασκεύασμα MPR 25  $\mu$ M), που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις της παρούσας εργασίας. Με την προτεινόμενη μέθοδο μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η δραστικότητα παρασκευασμάτων MPR, αρκεί η συγκέντρωση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA, εντός της κυψελίδας, να είναι περίπου  $8.016E-3$  mM, ενώ ο εκάστοτε χρησιμοποιούμενος όγκος διαλύματος MPR (5, 10, 15, κ.λ.π.  $\mu$ L), στην κυψελίδα, να μεταβάλλεται με αντίστοιχη μείωση ή αύξηση του όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι ώστε ο παραγόμενος φθορισμός να βρίσκεται εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Τότε, οι υπολογιζόμενες I.U. θα πρέπει να πολλαπλασιάζονται και να ανάγονται στον αρχικό όγκο του υπό έλεγχο παρασκευάσματος MPR.

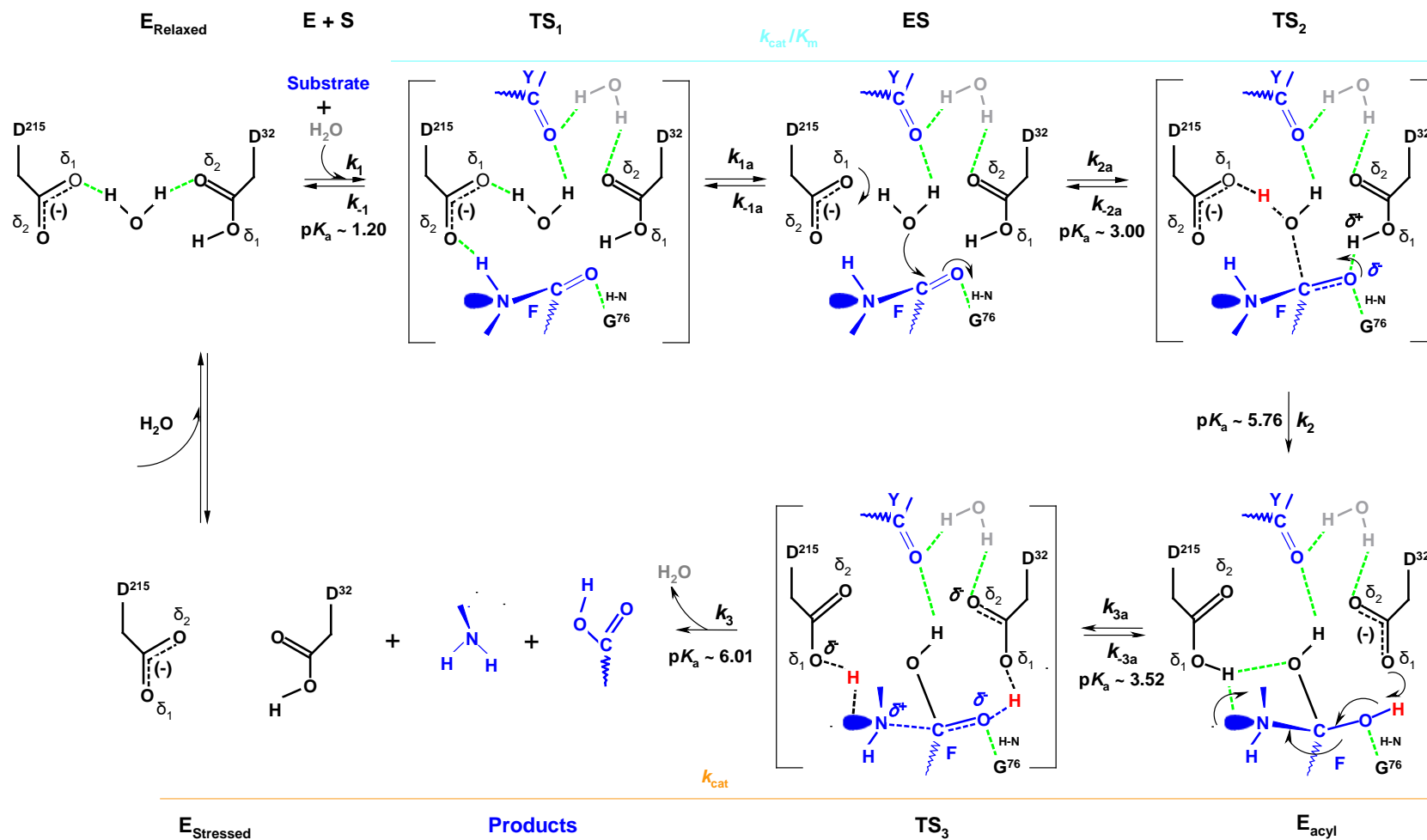
Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της MPR σε ακινητοποιημένη μορφή χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις βιοκαταλύτες B1 - B4 (ακινητοποιημένη MPR σε σωληνωτή κυτταρίνη και σε σύνθετα υλικά σωληνωτής κυτταρίνης-αμύλου), οι οποίοι παρασκευάστηκαν με σκοπό την χρήσή τους στην παραγωγή τυριού. Έτσι, υπολογίστηκε ότι 0.11480 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-1, 0.10824 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-2, 0.09359 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-3 και 0.08944 I.U. αντιστοιχούν σε 3.5 g στερεού Βιοκαταλύτη-4. Με την προτεινόμενη μέθοδο μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η δραστικότητα ακινητοποιημένου ενζύμου MPR (ρεννίνης), αρκεί να ληφθούν υπόψη οι προαναφερόμενες συνθήκες (ενότητα 2B.9.2.α) και με χρήση του Abz-GFY-pNA, αρκεί ο παραγόμενος φθορισμός να βρίσκεται εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης. Αν η τελευταία αυτή συνθήκη δεν πληρούται, συνιστάται η χρήση μικρότερης ποσότητας βιοκαταλύτη.

Οι προτεινόμενες μέθοδοι χαρακτηρίζονται από υψηλή γραμμικότητα (< 98%), τα όρια ανίχνευσης φθορισμού εκτείνονται από πολύ χαμηλές (< 100) ως πάρα πολύ υψηλές (6000 >) τιμές φθορισμού και επαναληψιμότητα όπου οι τυπικές αποκλίσεις των πολλαπλών μετρήσεων (8) ανά πειραματικό σημείο, βρέθηκαν μικρότερες του 3.5%. Επίσης, οι βιοκαταλύτες ακινητοποιημένης MPR (B1 - B4) χρησιμοποιήθηκαν για επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις πήξης του γάλακτος όπου διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των προσδιοριζόμενων I.U. και του χρόνου πήξης του γάλακτος (μείωση των I.U. με ανάλογη αύξηση του αντίστοιχου χρόνου πήξης του γάλακτος).

Έτσι, εκπληρώνεται το ζητούμενο της ανάπτυξης μιας αυτοματοποιημένης στατιστικά ισχυρής και ευαίσθητης μεθόδου προσδιορισμού της δραστικότητας της MPR σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή. Ιδιαίτερα, η προτεινόμενη μέθοδος για τους ακινητοποιημένους βιοκαταλύτες κι η υψηλή συσχέτιση μεταξύ των προσδιοριζόμενων I.U. και του χρόνου πήξης του γάλακτος δίνει την προοπτική της εφαρμογής της σε βιοκαταλυτικές διαδικασίες παραγωγής τυριού σε βιομηχανική κλίμακα.

Ένας ακόμη στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της MPR από το μικροοργανισμό *Rhizomucor pusillus* με προοπτική την ευρεία χρήση του ενζύμου αυτού όχι μόνο στην βιομηχανία τροφίμων (παραγωγή τυριού), αλλά και σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου δεν ήταν σαφής εξαιτίας της απουσίας κάποιου υποστρώματος κατάλληλου για ενζυμικές κινητικές μελέτες αφού τα ήδη υπάρχοντα συνήθως αναπαράγουν ή μιμούνται τα φυσικά υποστρώματα.

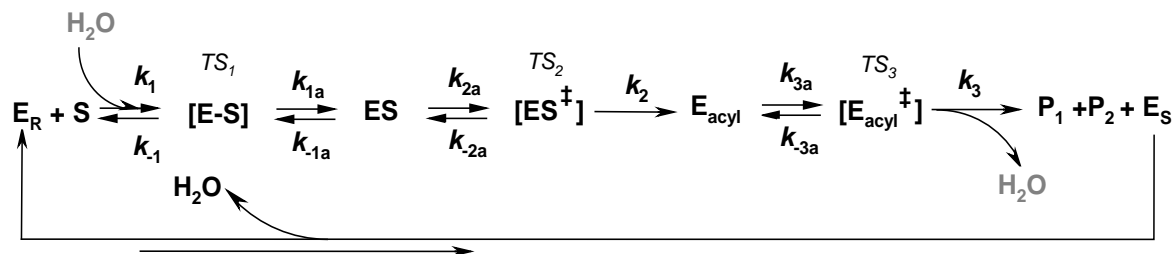
Δεδομένου ότι το υπόστρωμα Abz-GFY-pNA διαθέτει τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες κινητικές μελέτες και εφαρμόστηκε η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων για την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού από την MPR, όπου προέκυψαν αρκετά ενδιαφέροντα και νεωτεριστικά στοιχεία (βλ. ενότητες.3B.5-3B.7), τα οποία συνηγορούν υπέρ του ακόλουθου μηχανισμού δράσης για την MPR (**Σχήμα 4.3**).



Σχήμα 4.3: Πιθανός μηχανισμός δράσης του ενζύμου MPR (υδρόλυση του υποστρώματος Abz-GFY-pNA)

Στον παραπάνω μηχανισμό με πράσινο χρώμα και διάστικτη γραμμή παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου, με μπλε χρώμα παρουσιάζονται στοιχεία που αναφέρονται στο υπόστρωμα, με μαύρο χρώμα παρουσιάζονται στοιχεία που αναφέρονται στο ένζυμο, με μαύρο ή με μπλε χρώμα και διάστικτη γραμμή παρουσιάζονται γέφυρες υδρογόνου που αναφέρονται σε στοιχεία του ενζύμου ή του υποστρώματος, αντίστοιχα, με κόκκινο χρώμα αναφέρονται τα πρωτόνια που μεταφέρονται είτε σε θεμελιώδεις είτε και σε μεταβατικές καταστάσεις, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνεται ένα μόριο  $H_2O$  διαφορετικό από εκείνο του καταλυτικού κέντρου. Με την ένδειξη **F** είτε **Y** και σε χρώμα μπλε σημειώνονται στοιχεία από τα κατάλοιπα της φαινυλαλανίνης και τυροσίνης, αντίστοιχα, του χρησιμοποιηθέντος υποστρώματος Abz-GFY-pNA. Η αντίδραση ξεκινά με την πρόσδεση του υποστρώματος σε μια χαλαρωμένη μορφή του ενζύμου, με το μόριο του καταλυτικού  $H_2O$  να συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με τα καταλυτικά κατάλοιπα της MPR **D**<sup>32</sup> και **D**<sup>215</sup> τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές ιονικές μορφές. Ένα ακόμη μόριο  $H_2O$  (τουλάχιστον) συμμετέχει στην αντίδραση. Ο μηχανισμός, που έχει σχεδιαστεί τόσο με βάση τα αποτελέσματα των υπολογιστικών μελετών πρόσδεσης, μοριακής δυναμικής και μεταδυναμικής (docking, MD, metadynamics), όσο και με τα πειραματικά αποτελέσματα των κινητικών μετρήσεων, περιλαμβάνει τρεις μεταβατικές καταστάσεις, ενώ έχουν σημειωθεί και τα όρια (αντιδρώντα μοριακά είδη) των επιδράσεων των παραμέτρων  $k_{cat}/K_m$  και  $k_{cat}$ . Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του προτεινόμενου μηχανισμού είναι και οι αναστροφές, τόσο του ηλεκτρικά ουδέτερου, πλέον,  $\beta$ -καρβοξυλίου του καταλυτικού κατάλοιπου **D**<sup>215</sup> της MPR (έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου **N** του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού, προς το πρωτόνιο αυτού του καρβοξυλίου), όσο και του ατόμου **N** πέριξ του τέως υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος έχασε τον χαρακτήρα διπλού δεσμού στο τετραεδρικό ενδιάμεσο (**E**<sub>acyl</sub>) λίγο πριν την διάσπασή του. Στην συνέχεια απελευθερώνονται τα προϊόντα της υδρόλυσης (αμινικό και καρβοξυλικό) και το ελεύθερο ένζυμο (MPR) σε σφιχτή (πιεσμένη) μορφή, το οποίο μετατρέπεται σε χαλαρωμένη μορφή με πρόσληψη ενός μορίου  $H_2O$  που καταλαμβάνει την κατάλληλη θέση στο καταλυτικό κέντρο της MPR και

την προετοιμάζει για ένα νέο καταλυτικό κύκλο. Ο ίδιος μηχανισμός διατυπώνεται και περιληπτικά με το παρακάτω σχήμα αντιδράσεων (**Σχήμα 4.4**).



**Σχήμα 4.4:** Η σειρά αντιδράσεων του μηχανισμού, του Σχήματος 4.3.

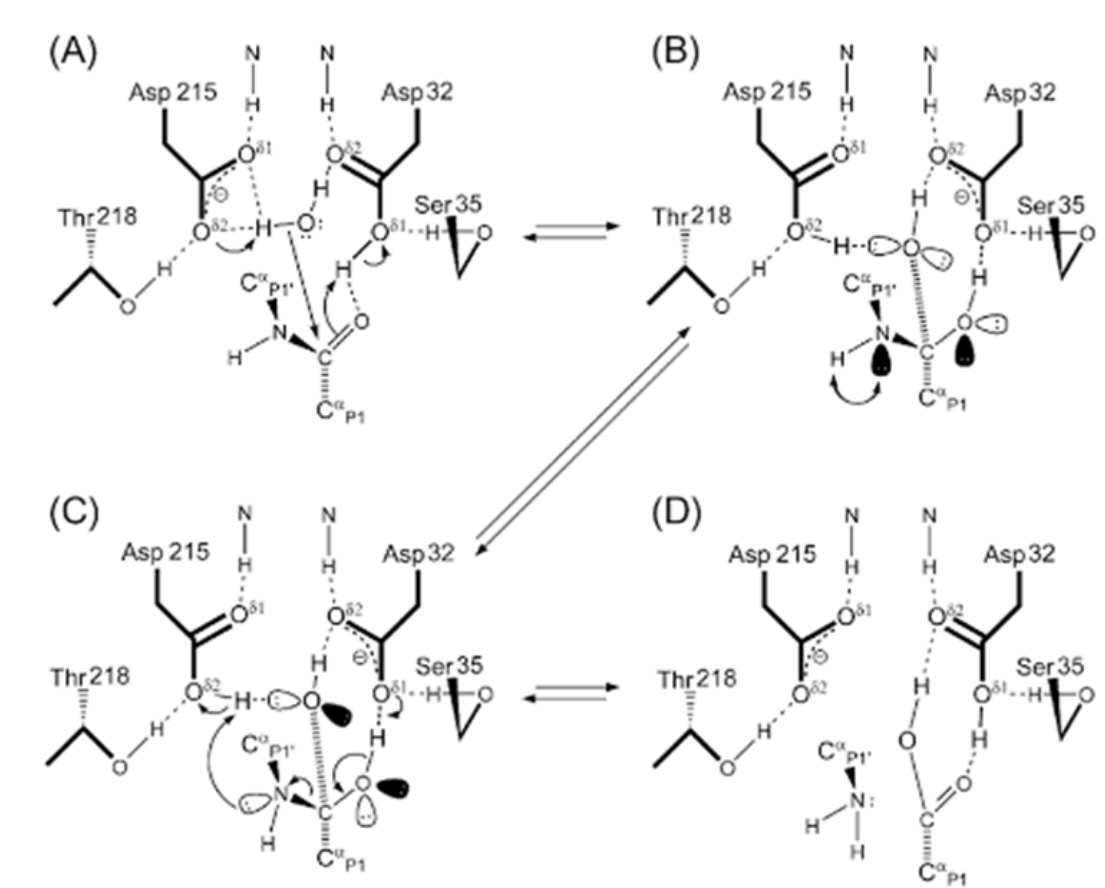
Στο παρόν κρίνεται σκόπιμο να πραγματοποιηθεί σύγκριση του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης της ασπαρτικόπρωτεϊνάσης MPR με τον γενικά αποδεκτό κατά την υπάρχουσα βιβλιογραφία μηχανισμό δράσης των ασπαρτικόπρωτεϊνάσων (**Σχήμα 1.6**), όπου αμέσως σημειώνονται αρκετές κυρίως διαφορές:

➤ Όσον αφορά το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος ES (**Σχήμα 1.6A**) φαίνεται ότι το καταλυτικό μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  συνεχίζει να συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου και με τα δύο καταλυτικά κατάλοιπα  $\text{D}^{32}$  και  $\text{D}^{215}$ , κάτι που είναι εντελώς διαφορετικό από αυτά που εμείς αποδείξαμε, δηλαδή ότι το καταλυτικό μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  (στο ES) συνδέεται με δεσμό υδρογόνου μόνο με το καταλυτικό κατάλοιπο  $\text{D}^{215}$ , αλλά και με ένα ακόμη δεσμό H με το καρβοξύλιο της  $\text{Y}_{\text{C}=\text{O}\cdots}$  (του υποστρώματος), ενώ δέχεται πηρυνόφιλη προσβολή από το καταλυτικό  $\text{D}^{215}$ , όπως αποδείχθηκε από τα υπολογιστικά και πειραματικά μας δεδομένα.

➤ Στις αναπαραστάσεις (B) και (Γ) του **Σχήματος 1.6**, τόσο στην μεταβατική κατάσταση όσο και στο  $\text{E}_{\text{acyl}}$ , το καταλυτικό μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  συνεχίζει να συνδέεται με το ένζυμο με δεσμούς υδρογόνου και με τα δύο καταλυτικά D ( $\text{D}^{32}$  και  $\text{D}^{215}$ ). Στον προτεινόμενο μηχανισμό (**Σχήμα 4.3**) για την MPR έχουμε αποδείξει (υπολογιστικά) ότι στο  $\text{E}_{\text{acyl}}$ , το υδροξύλιο του καταλυτικού  $\text{H}_2\text{O}$  (αυτό έχει μείνει) συνδέεται μόνο με το καρβοξύλιο της  $\text{Y}_{\text{C}=\text{O}\cdots}$  (του υποστρώματος).



➤ Στο (Δ) του **Σχήματος 1.6** στο οποίο αναπαρίσταται η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού παρατηρείται ομοιότητα με τον προτεινόμενο μηχανισμό αλλά είναι αδιευκρίνιστη η συνέχεια της αντίδρασης και το τί συμβαίνει τελικά στο καταλυτικό μόριο  $H_2O$ . Στον μηχανισμό του **Σχήματος 4.3** θεωρούμε (έχει αποδειχθεί) ότι ένα υδροξύλιο, από αυτό το μόριο του καταλυτικού  $H_2O$ , συμμετέχει στον σχηματισμού του προϊόντος οξέος.



**Σχήμα 1.6A-D:** (A) αναπαράσταση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, (B) Τετραεδρικό ενδιάμεσο, (Γ) μοντέλο για πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας, (Δ) η διάσπαση του δεσμού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλειονότητα των λεπτομερειών, όσον αφορά τον μηχανισμό υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών από την οικογένεια των ασπαρτικοπρωτεϊνών έχουν προκύψει κυρίως από δομικές μελέτες αυτών των ενζύμων κι έτσι πληροφορίες σχετικές με το που βρίσκονται και πώς μεταφέρονται πρωτόνια μπορούν να εξαχθούν μόνο με συστηματική μελέτη και εργαλεία, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Στην περίπτωση της MPR αξιολογήθηκαν δεδομένα από υπολογιστικές

δομικές μελέτες, καθώς και από πειραματικά κινητικά δεδομένα (Πειραματικό μέρος - μέθοδοι), κι έτσι ποσαφηνίστηκαν αρκετά σημεία-κλειδιά του μηχανισμού δράσης του ενζύμου αυτού που ενδεχομένως να μπορούν να αντιστοιχηθούν και σε άλλες ασπαρτικοπρωτεΐνες.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



1. Rawlings ND & Barret AJ. Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology* 1994; 244: 461-486.
2. Venkatasubban KS & Schowen RL. The Proton Inventory Technique. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1985; 17: 1-4.
3. Bieth JG. *Front Matrix Biol.* 1978; 6: 1-82.
4. Stein RL, Strimpler AM, Hori H & Powers JC. Catalysis by human leukocyte elastase: proton inventory as a mechanistic probe. *Biochemistry* 1987; 26: 1305-1314.
5. Polgár L, Asboth B, & Korodi I, (1986) in "Cysteine Proteinases and their inhibitors" Ed. Vito Turk, Walter De Gruyter and Co, New York, p 328
6. Stein RL. Catalysis by human leukocyte elastase: substrate structural dependence of rate-limiting protolytic catalysis and operation of the charge relay system. *J. Am. Chem. Soc.* 1983; 105: 5111-5116.
7. Blow D, Birktoft J & Hortley BS. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature (London)* 1969; 221: 337-340.
8. Hunkapiller M, Forgac M, & Richards J. Mechanism of action of serine protease: Tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry* 1976; 15: 5581-5588.
9. Fink A & Meehan P. Detection and accumulation of tetrahedral intermediates in elastase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76: 1566-1569.
10. Ménard R & Storer A. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biol. Chem.* 1992; Hoppe-Seyler 373: 393-400.
11. Olson MO, Nagabhushan N, Dzwiniel M, Smillie LB, & Whitaker DR. Primary structure of alpha-lytic protease: a bacterial homologue of the pancreatic serine proteases. *Nature* 1970; 228: 438-442.
12. Hunkapiller MW, Smallcombe SH, Whitaker DR & Richards JH. Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in alpha-lytic protease. Implications for the catalytic mechanism of serine proteases. *Biochemistry* 1973; 12:4732-4743
13. Pelmont J (1989) "Enzymes". Presses Universitaires de Grenoble.
14. Delbaere LTJ, Hutcheon WLB, James MNG & Thiessen WE. Tertiary structural differences between microbial serine proteases and pancreatic serine enzymes. *Nature* 1975; 257: 758-763.
15. Craik CS, Rutter WJ & Fletterick R. Splice junctions: association with variation in protein structure. *Science* 1983; 220:1125-1129.

16. Ekici OZ, Paetzel M & Dalbey RE. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science* 2008; 17:2023-2037.
17. Bieth JG. Elastases: catalytic and biological properties. New York: Academic Press 1986, pp. 217–320.
18. Werb Z, Banda MJ, McKerrow JH & Sandhaus RA. Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol* 1982; 79:154–9.
19. Powers JC. Inhibitors of Elastase and Pulmonary Emphysema, *Trends Biochem. Sci.* 1976; 1: 211-214.
20. Buchardi H. Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS); Experimental Models with Elastase and Thrombin Infusion in Pigs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1984; 167:319-333.
21. Geokas MC, Murphy R & McKenna RD. The Role of Elastase in Acute Pancreatitis I. Intra-pancreatic Elastolytic Activity in Bile-induced Acute Pancreatitis in Dogs. *Arch. Pathol.* 1968; 86: 117-126.
22. Davis PB. (1983) in Text Book of Cystic Fibrosis (Lloyd-Still, J.D., Eds.) pp 351-369, John Wright PSG Inc., Boston.
23. Meyer E, Cole G, Radhakrishnan R & Epp O. Structure of native porcine pancreatic elastase at 1.65 Å resolution. *Acta. Cryst. B* 1988; 44: 26-38.
24. Shotton DM, Hartley BS. Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* 1970; 225:802–6.
25. Atlas D. The active site of porcine elastase. *J. Mol. Biol.* 1975; 93: 39-53.
26. Davril M, Jung ML, Duportail G, Lohez M, Han KK & Bieth, JG. Arginine modification in elastase - effect on catalytic activity and conformation of the calcium-binding site. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:3851-3857.
27. Bieth JG & Wermuth CG. The action of elastase on p-nitroanilide substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973; 53: 383-390.
28. Dimicoli JL, Renaud A, Lestienne P & Bieth JG. The Interaction of Trifluoroacetyl Peptide Chloromethyl Ketones with Porcine Pancreatic Elastase. Direct Evidence for Nonproductive enzyme-inhibitor Complexes. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 5208-5218.
29. Meyer EF, Jr. Radhakrishnan R, Cole GM & Presta LG. Structure of the product complex of acetyl-Ala-Pro-Ala with porcine pancreatic elastase at 1.65 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 1986; 189: 533-539.
30. Phillips MA & Fletterick RJ. Proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992; 2: 713-720.

31. Hughes DL, Sieker LC, Bieth J & Dimicoli J-L. Crystallographic Study of the Binding of a Trifluoroacetyl Dipeptide Anilide Inhibitor with Elastase. *J. Mol. Biol.* 1982; 162:645-658.
32. Takahashi LH, Radhakrishnan R, Rosenfield RE, Meyer EF, Trainor DA & Stein M. X-Ray Diffraction Analysis of the Inhibition of Porcine Pancreatic Elastase by a Peptidyl Trifluoromethylketone. *J. Mol. Biol.* 1988; 201:423-428.
33. Meyer EF, Presta LG & Radhakrishnan R. Stereospecific Reaction of 3-Methoxy-4-chloro-7-aminoisocoumarin with Crystallin Porcine Pancreatic Elastase, *J. Am. Chem. Soc.* 1985; 107: 4091-4093.
34. Mattos C & Ringe D. (1993). Multiple Binding Modes, in QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications (Kubinyi, H., Ed.) pp 226-254, ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands
35. Renaud A, Lestienne P, Hughes DL, Bieth JG & Dimicoli J-L. Mapping of the S' Subsites of Porcine Pancreatic and Human Leucocyte Elastases. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:8312-8316.
36. Li de la Sierra I, Papamichael EM, Sakarellos C et al. Interaction of the peptide CF<sub>3</sub>-Leu-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CF<sub>3</sub> (TFLA) with porcine pancreatic elastase. X-ray studies at 1.8Å. *J Mol Recognit* 1990; 3:36-44.
37. Mattos C, Rasmussen B, Ding X, Petsko GA & Ringe D. Analogous Inhibitors of Elastase do not Always Bind Analogously. *Nature Struct. Biol.* 1994; 1:55-58.
38. Madala PK, Tyndall JD, Nall T & Fairlie DP. Update 1 of: proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem Rev* 2010; 110:PR1-PR31.
39. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J & Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 2008; 36: D320-D325.
40. Coates L, Erskine PT, Wood SP, Myles DA, Cooper JB. A neutron Laue diffraction study of endothiapepsin: implications for the aspartic proteinase mechanism. *Biochemistry* 2001; 40:13149-13157.
41. Pearl LH & Blundell TL. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 1984; 174:96-101.
42. Claverie-Martin F, Vega-Hernandez MC (2007). Aspartic proteases in cheese making. In: Poliana J, Maccabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, New York, pp 207-219
43. Madala PK, Tyndall JD, Nall T, Fairlie DP. Update 1 of: proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem Rev* 2010; 110:PR1-PR31.

44. Dunn BM. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev* 2002; 102:4431–4458.
45. Dash C, Kulkarni A, Dunn B & Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev BiochemMol Biol.* 2003; 38:89–119.
46. Wloadwer A & Erickson JW. Structure- based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 1993; 62: 543-585.
47. Clement GE. (1973). Catalytic activity of pepsin, in: *Progress in Bioorganic Chemistry*, Kaiser, E.T., Kezdy, F.J., eds., New York: John Willey & Sons, pp.177-238.
48. Cornish-Bowden AJ & Knowles JR. The pH dependence of pepsin-catalysed reactions. *Biochem. J.* 1969; 113(2): 353-362.
49. Clement GE, Rooney J, Zakheim D & Eastman J. pH dependence of the dephosphorylated pepsin-catalyzed hydrolysis of N- acetyl-L-phenylalanyl-L-tyrosine methyl ester. *J.Chem. Soc.*1970; 92(1): 186-189.
50. Bode W & Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur.J. Biochem.* 1992; 204(2): 433-45137.
51. Laskowski M, Qasim MA. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta.*2000; 1477(1-2): 324-337.
52. James MNG. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine –and difluorostatone- containing peptides. *Biochemistry* 1994; 31(15): 3872-3886.
53. Blundell TL, Cooper J, Founding SI, Jones DM, Atrash B & Szelke M. On the rational design of renin inhibitors: X-ray studies of aspartic proteinases complexed with transition-state analogues. *Biochemistry* 1987; 26(18): 5585-5590.
54. Park YN, Aikawa J, Nishiyama M, Horinouchi S & Beppu T. Involvement of a residue at position 75 in the catalytic mechanism of a fungal aspartic proteinase, *Rhizomucor pusillus* pepsin. Replacement of tyrosine 75 on the flap by asparagine enhances catalytic efficiency. *Protein Eng.* 1996; 9(10): 869-875.
55. Bizzozero SA & Dultler H. Stereochemical aspects of peptide hydrolysis catalyzed by serine proteases of the chymotrypsin type. *Biorganic Chem* 1981; 10: 46-62.
56. Cleland WW. Low-barrier hydrogen bond unifies the mechanism of the aspartic proteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 382(1):1-5.

57. Piana S & Carloni P. Conformational flexibility of the catalytic Asp dyad in HIV-1 protease: An ab initio study on the free enzyme. *Proteins* 2000; 39(1): 26-36.
58. Coates L, Tuan HF, Tomanicek S, Kovalevsky A, Mustyaakimov M, Erskine P & Cooper J. The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction. *J.Am.Chem. Soc.* 2008; 130(23): 7235-7237.
59. Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD & Davies DR. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 7009-7013.
60. Davies DR. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1990; 19: 189-215.
61. Ζερφυρίδης Γ. (2001). Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος. Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη, σελ 73-77.
62. Κουτίνιας ΑΑ & Κανελλάκη Μ. (2009). Χημεία και τεχνολογία τροφίμων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα, σελ. 345-362
63. Moatsou G, Vamvakaki A-N, Mollé D, Anifantakis E & Léonil J. Protein composition and polymorphism in the milk of Skopelos goats. *Lait* 2006; 86: 345-357.
64. Pirisi A, Piredda G, Papoff CM, di Salvo R, Rintus S, Garro G, Ferranti P & Chianese L. Effects of sheep alpha s-1 casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties, *J. Dairy Res.* 1999; 66: 409-419.
65. Horn D. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy J.* 1998; 8:171-177.
66. Walstra P, Wouters JTM & Geurts TJ. *Dairy Science and Technology*, 2006, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 497–512.
67. Claverie-Martin F, Vega-Hernandez MC (2007) Aspartic proteases in cheese making. In: Polaina J, Maccabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, Netherlands, pp 207–219.
68. Etoh Y, Shoun H, Beppu T & Arima K. Physicochemical and immunochemical studies on similarities of acid proteases *Mucor pusillus* and *Mucor miehei* rennin. *Agric. Biol. Chem.* 1979; 43: 209-215.
69. Boel E, Bech AM, Randrup K, Draeger B, Fiil NP & Foltmann B. Primary structure of a precursor to the aspartic proteinase of from *Rhizomucor miehei* shows that the enzyme is synthesized as a zymogen. *Proteins* 1986; 1:363-369.



70. Gray GL, Hayenga K, Cullen D, Wilson LJ & Norton S. Primary structure of *Mucor miehei* aspartyl protease: evidence for a zymogen intermediate. *Gene* 1986; 48: 41-53.
71. Tonouchi N, Shoun H, Uozumi T & Beppu T. Cloning and sequencing of a gene for *Mucor* rennin, an aspartate protease from *Mucor pusillus*. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14: 7557-7568.
72. Richardson GH, Nelson JH, Lubnow RE & Schwarberg RL. Rennin-like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 1967; 50:1066-1072.
73. Groves MR, Dhanaraj V, Badasso M, Nugent P, Pitts JE, Hoover DJ, Blundell TL A 2.3 Å resolution structure of chymosin complexed with a reduced bond inhibitor shows that the active site beta-hairpin flap is rearranged when compared with the native crystal structure. *Protein Eng* 1998; 11:833–840
74. Chitpinyol S, Crabbe MJC Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem* 1998; 61:395–418
75. Dunn BM, Jimerez M, Parten BF, Valler MJ, Rolph CE & Kay J. A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases. *Biochem. J.* 1986; 237: 899-906.
76. Martin P. Hydrolysis of the synthetic chromophoric hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-OMe catalyzed by bovine pepsin A. Dependence on pH and effect of enzyme phosphorylation level. *Biochim Biophys Acta* 1984; 791(1):28–36.
77. Martin P, Trieu-Cuot P, Collin JC, Ribadeau Dumas B. Purification and characterization of bovine gastricsin. *Eur J Biochem.* 1982; 122(1):31–39.
78. Oka, T., Ishino, K., Tsuzuki, H., Morihara, K., Arima, K. (1973). On the specificity of a rennin-like enzyme from *Mucor pusillus*. *Agric. Biol. Chem.* 1973; 37:1177-1184.
79. Somkuti GA & Babel FJ. Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bacteriol.*1968; 95: 1407-1414.
80. Oka, T., Ishino, K., Tsuzuki, H., Morihara, K., Arima, K. (1973). On the specificity of a rennin-like enzyme from *Mucor pusillus*. *Agric. Biol. Chem.* 1973; 37:1177-1184.
81. Arima K, Yu J & Iwasaki S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt. Methods Enzymol.* 1970;19: 446-459 .
82. Anson MI. Estimation of pepsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J.Gen. Physiol.* 1938;22: 79-89.

83. Schlamowitz M & Peterson LU. Studies on the optimum pH for the action of pepsin on native and denatured bovine serum albumin and bovine haemoglobin. *J.Biol. Chem.*1959; 234: 3137-3145.
84. Martin P, Raymond MN, Bricas E & Ribadeau Ducas B. Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* proteases and chymosin A and B on a synthetic chromophoric peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1980; 612: 410-420.
85. Bongrand P. Ligand-Receptor Interactions, *Reports on Progress in Physics* 1999; 62:921-968.
86. Halperin I, Ma B, Wolfson H & Nussinov R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 2002; 47: 409-443.
87. Ehrlich LP & Wade CR. "Protein-Protein Docking". *Reviews in Computational Chemistry* 2001; 17.
88. Hernández-Santoyo A, Tenorio-Barajas AY, Altuzar V, Vivanco-Cid H & Mendoza-Barrera C, (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking, Protein Engineering - Technology and Application, Dr. Tomohisa Ogawa (Ed.), ISBN: 978-953-51-1138-2, InTech, DOI: 10.5772/56376.
89. Wodak SJ & Janin J. Computer Analysis of Protein-Protein Interactions. *J. Mol. Biol.* 1978; 124 (2): 323–342.
90. Dhanik A & Kavradi LE, (2012). Protein-Ligand Interactions: Computational Docking. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0004105.pub2.
91. Hernández-Santoyo A, Tenorio-Barajas AY, Altuzar V, Vivanco-Cid H & Mendoza-Barrera C, (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking, Protein Engineering - Technology and Application, Dr. Tomohisa Ogawa (Ed.), ISBN: 978-953-51-1138-2, InTech, DOI: 10.5772/56376
92. Bongrand P. Ligand-Receptor Interactions. *Reports on Progress in Physics* 1999; 62:921-968.
93. Halperin I, Ma B, Wolfson H & Nussinov R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 2002; 47: 409-443.
94. Dias R & Filgueira de Azevedo Jr. W. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets* 2008; 9:1040-1047.
95. Manhold R, Kubinyi H & Timmerman H. "Bioinformatics-From Genomes to Drugs", Wiley-VCH, 2001.

96. Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH & Teller E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *Journal of Chemical Physics* 1953; 21: 1087–1092.
97. Sousa SF, Fernandes PA & João Ramos M. Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 2006; 65:15–26.
98. Schrödinger Inc., San Diego, CA 92122 (<http://www.schrodinger.com>)
99. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV & Mee RP. Empirical scoring functions I: The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer Aided Molecular Design* 1997; 11:425–445.
100. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P & Shenkin PS. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *J. Med. Chem.* 2004; 47: 1739-1749.
101. Glide User Manual, Schrödinger Inc., San Diego, CA 92122 (<http://www.schrodinger.com>)
102. van Gunsteren WF, Dolenc J, Mark AE. Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Current Opinion in Structural Biology* 2008; 18(2):149–153.
103. Di Nola A, Roccatano D, Berendsen HJC. Molecular dynamics simulation of the docking of substrates to proteins. *Proteins* 1994; 19:174–182.
104. Karplus M & McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* 2002; 9: 646–652.
105. Adcock SA & McCammon JA. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem Rev.* 2006; 106(5): 1589–1615.
106. McQuarrie DA. *Statistical Mechanics*. Harper and Row; New York: 1976.
107. Callen HB. *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*. Wiley; New York: 1985.
108. Alonso H, Bliznyuk AA & Gready JE. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research Reviews* 2006 ; 26(5):531-568.
109. Desmond Molecular Dynamics System, version 2.2, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2009. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 2.2, Schrödinger, New York, NY, 2009.
110. Bowers KJ, Chow E, Xu H, Dror RO, Eastwood MP, Gregersen BA, Klepeis JL, Kolossvary I, Moraes MA, Sacerdoti FD, Salmon JK, Shan Y & Shaw DE.

- Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters, Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida, November 11-17, 2006.
111. Hansson T, Oostenbrink C & van Gunsteren WF. Molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology* 2002; 12(2):190–196.
  112. Pauling L, Corey RB & Branson HR. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *PNAS* 1951; 37: 235-240.
  113. Bergmann M, Zervas L. A general process for the synthesis of peptides. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1932; 65B: 1192–1201.
  114. Bergman M, Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1932; 65: 1192–1201.
  115. McKay FC, Albertson NF. New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79: 4686-4690.
  116. Sieber P & Iselin B. Selective acidolytic cleavage of aralkyl carbonyl amino protecting groups. *Helv. Chim. Acta* 1968; 51: 614-622.
  117. Smeby RR & Femandjian S, (1978) in Weinstein, B. (Ed.) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Marcel Decker Inc, New York, 117.
  118. Carpino LA, Han GY. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem* 1972; 37: 3404-3409.
  119. Miller HK & Waelsch H. Benzyl Esters of Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; 74:1092-1093.
  120. Roeske R. Preparation of t-Butyl Esters of Free Amino Acids. *J. Org. Chem.* 1963; 28:1251-1253.
  121. Brenner M. & Huber W. Herstellung von  $\alpha$ - Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv. Chim. Acta* 1953; 36: 1109-1115.
  122. Bamachandran J & Li CH. Preparation of Crystalline NG-Tosylarginine Derivatives. *J. Org. Chem.* 1962; 27: 4006-4009.
  123. Losse G & Krychowski U. Neue histidin-derivate für die merrifield-peptidsynthesex. *Tetrahedron Lett.* 1971; 4121-4124.
  124. Brown T & Jones JH Richards JD. Further studies on the protection of histidine side chains in peptide synthesis: the use of the  $\pi$ -benzyloxymethyl group. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1982; 1553-1561.
  125. McKay FC & Albertson NF. New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79: 4686-4690.

126. Erickson BW & Merrifield RB. Use of chlorinated benzyloxycarbonyl protecting groups to eliminate N epsilon.-branching at lysine during solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1973; 95: 3757-3763.
127. Carpino LA, Shroff H, Triolo S, Mansour ES, Wenschul H & Albericio F. The 2,2,4,6,7- pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Lett.* 1993; 34: 7829-7832.
128. Konig W & Geiger R. A new amide protecting group, (methoxybenzhydryl). *Chem Ber* 1970; 103: 2041-2051.
129. Sieber S & Riniker B. Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. 1991; 32: 739-742.
130. Sieber R & Riniker B. Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Lett.* 1987; 28: 6031-6034.
131. Aletras A, Barlos K, Gatos D, Koutsogianni S & Mamos P. Preparation of the very sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Application in the synthesis of side-chain to side-chain cyclic peptides and oligolysine cores suitable for the solidphase assembly of MAPs and TASPs. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1995; 45: 488-496.
132. Williams AW & Young GT. Amino-acids and peptides. XXXV. The effect of solvent on the rates of racemization and coupling of some acylamino-acid p-nitrophenyl esters; the base strengths of some amines in organic solvents, and related investigations. *J Chem Soc [Perkin 1]* 1972; 9: 1194-1200.
133. Khorana HG. "Peptides. Part III. Selective Degradation from the Carboxyl End. The Use of Carbodiimides" *J. Chem. Commun.* 1952; 2081-2088.
134. Sheehan JC & Hess GP. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 1955; 77: 1067-1068.
135. Khorana HG & Todd AR. Studies on Phosphorylation. Part XI. The Reaction between Carbodiimides and Acid Esters of Phosphoric Acid. A New Method for the Preparation of Pyrophosphates. *J. Chem. Soc.* 1953; 2257-2260.
136. Khorana HG. Observations on the Use of Dicyclohexylcarbodiimide in the Synthesis of Peptides. *Chem. Ind.* 1955; 1087.
137. Sarantakis D, Teichman J, Lien EL & Fenichel RL. A Novel Cyclic Undecapeptide, WY-40,770, with Prolonged Growth Hormone Release Inhibiting Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976; 73: 336-342.
138. Smith M, Moffat JG & Khorana HG. Carbodiimides. VIII. Observations on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; 80: 6204-6212.

139. Merrifield RB, Gisin BF & Bach AN. The Limits of Reaction of Radioactive Dicyclohexylcarbodiimide with Amino Groups during Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* 1977; 42: 1291-1295.
140. König W & Geiger R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* 1970b; 103: 788-798.
141. König W & Geiger R. Racemisierung bei Peptidsynthesen. *Chem. Ber.* 1970c; 103: 2024-2033.
142. Wünsch E & Drees F. Darstellung der Sequenz 22-29. *Chem. Ber.* 1966; 99: 110-120.
143. König W & Geiger R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1.2.3-benzotriazin. *Chem. Ber.* 1970a; 103: 2034-2040.
144. Curtius T. Über die Einwirkung von Chlorbenzoyl auf Glycocollsilber (vorläufige Mitt.). *J. Prakt. Chemie.* 1881; 2: 239-240.
145. Wieland T, Kern W. & Sehring R. Über Anhydride von Acylierten Aminosäuren. *Ann. Chem* 1950; 569: 117-121.
146. Weygand F, Huber P & Weiss K. Peptide Syntheses with Symmetrical Anhydrides. *Z. Naturforsch. B* 1967; 22:1084-1085.
147. Weygand F & Di Bello C. Peptide Syntheses with Ssymmetrical Anhydrides. II. *Z. Naturforsch.B.* 1969; 24:314-317.
148. Vaughan JR & Osato RL. Preparation of Peptides Using Mixed Carboxylic Acid Anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* 1951; 73: 5553-5555.
149. Boissonnas RA. Une Nouvelle Méthode de Synthèse Peptidique. *Helv. Chim. Acta* 1951; 34: 874-879.
150. Vaughan JR & Osato RL. The Preparation of Peptides Using Mixed Carbonic-Carboxylic Acid Anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; 74: 676-678.
151. Bodanszky M & Du Vigneaud V. A Method of Synthesis of Long Peptide Chains Using a Synthesis of Oxytocin as an Example. *J. Am. Chem. Soc.* 1959; 81: 5688-5691.
152. Pless J. & Boissonnas RA. Über die Geschwindigkeit der Aminolyse von Verschiedenen Neuen, Aktivierten, N-Geschützten  $\alpha$ -Aminosäurephenylestern, Insbesondere 2,4,5-Trichlorphenylestern. *Helv. Chim. Acta* 1963; 46: 1609-1625.
153. Kovacs J, Ceprini MQ, Dupraz CA & Schmit GN. Pentachlorophenyl Esters of N-Carbobenzoxy-L-Amino Acids. *J. Org. Chem.* 1967a; 32: 3696-3098.

154. Kovacs J, Kisfaludy L & Ceprini MQ. On the Optical Purity of Peptide Active Esters Prepared by N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide and "Complexes" of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Pentachlorophenol and N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide- Pentafluorophenol. *J. Am. Chem. Soc.* 1967b; 89:183-184.
155. Horiki K. Behavior of Acylated 1-Hydroxybenzotriazole. *Tetrahedron Lett.* 1977; 18: 1897-1900.
156. Curtius T. Synthetische Versuche mit Hippurazid. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1902; 35:3226-3228.
157. Castro B, Dormay JR, Evin G & Selve C. Reactifs de couplage peptidique BOP. *Tetrahedron Lett.* 1975; 14:1219-1222.
158. Coste J, Le-Ngyen D & Castro B. PyBoP- a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* 1990; 31:205-208.
159. Knorr R, Tizeciak, Bannwarth W, Gillensen D. New coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* 1989; 30: 1027-1930.
160. Deschepper CF & Cannong WF. *Frontiers in Neuroendocrinology*, Raven, New York, 1988; 79.
161. Caprino CA. HATU – An efficient peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; 115:4397-4398.
162. Gawne G, Kenner GW & Sheppard RC. Acyloxyphosphonium Salts as Acylating Agents. A New Synthesis of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 1969; 91: 5669-5671.
163. Kemp DS & Chien SW. Specific base catalysis of azlactone formation. *J. Am. Chem. Soc.* 1967; 89: 2745-2746.
164. Jarrett JT & Lansbury PT. Improved Coupling of Protected Peptides on the Kaiser Oxime Resin Using Bop Activation. *Tetrahedron Lett.* 1990; 31: 4561-4564.
165. Pedroso E, Grandas A, De las Heras X, Eritja R & Giralt E. Diketopiperazine Formation in Solid Phase Peptide Synthesis Using p-Alkoxybenzyl Ester Resins and Fmoc-Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* 1986; 27: 743-746.
166. Merrifield R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85: 2149-2154.
167. Dixon M & Webb EC, (1971) in *ENZYMES* 2<sup>nd</sup> Edition pp. 92-111, LONGMAN: London
168. Henri V.R. General theory of action of certain hydrolases. *Acad. Sci. Paris* 1902; 135:916-919.

169. Michaelis L., & Menten M.L. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem.* 1913; Z. 49: 333-369
170. Segel I, (1975) “*Enzyme Kinetics*”, ed. John Wiley and Sons Inc.
171. Peller L & Alberty RA. Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics: I. The mechanism involving a single substrate and product. *J. Am. Chem. Soc.* 1959; 81: 5907-5914
172. Vindigni A & Di Cera E. Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry* 1996; 35: 4417-4426
173. Sárkány Z & Polgár L. The unusual catalytic triad of poliovirus protease 3C *Biochemistry* 2003; 42: 516-522
174. Laidler KJ & Meiser JH, 1982, Physical Chemistry, *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc*, London, pp.347-438.
175. Fersht A, 1998, Structure and Mechanism in Protein Science, *W.H. Freeman and Co.*, New York, pp. 349-364.
176. Papamichael EM & Theodorou LG. Experimental and theoretical approaches in investigating enzymatic mechanisms: Applications on the thermo-stable extracellular Protease-A-17N-1 from *Bacillus* sp., with possible biotechnological interest, in *Current Topics on Bioprocesses in Food Industry Vol III*, (2010), pp. 130-139, Editors: L.V Rao, A. Pandey, C. Larroche, C-R. Soccol & C-G. Dussap, Asiatic Publishers, INC. New Delhi, India
177. Topham CM, Salih E, Frazao C, Kowlessur D, Overington JP, Thomas M, Brocklehurst SM, Patel M, Thomas EW, & Brocklehurst K. Structure-function relationships in the cysteine proteinases actinidin, papain and papaya proteinase omega. Three-dimensional structure of papaya proteinase omega deduced by knowledge-based modelling and active-centre characteristics determined by two-hydronic-state reactivity probe kinetics and kinetics of catalysis. *Biochem. J.* 1991; 280: 79-92.
178. Microcal Software Inc, (1997) One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA, [www.microcal.com](http://www.microcal.com)
179. Venkatasubban K.S., & Schowen R.L. The proton inventory technique. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1984; 17: 1-44.
180. Schowen K.B., & Schowen R.L. Solvent isotope effects of enzyme systems. *Methods Enzymol.* 1982; 87: 551-606
181. Schowen K.B., (1978) “Solvent hydrogen isotope effects in Transition States of Biochemical Process”, ed. R.D.Gandour and R.L.Schowen Eds, Plenum Press, New York



182. Pollock E., Hogg J.L., & Schowen R.L. One-proton catalysis in the deacetylation of acetyl-a- chymotrypsin. *J.Am. Chem. Soc.* 1973; 95: 968-969.
183. Foukis A, Stergiou PY, Theodorou LG, et al. Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. *Bioresour Technol* 2012; 123: 214–20.
184. Papamichael EM, Stergiou PY, Foukis A, et al. Effective kinetic methods and tools in investigating the mechanism of action of specific hydrolases. In: Ekinici D, ed. Medicinal chemistry and drug design. Rijeka, Croatia: INTECH open science; 2012:235–74.
185. Lente G, Fábrián I, Poë AJ. A common misconception about the Eyring equation. *New J Chem* 2005;29:759-760.
186. Cleland WW & Northrop DB. Energetics of substrate binding, catalysis, and product release. *Methods in Enzymology* 1999;308:3-27.
187. Bieth JG, Dirrig S, Jung ML, Boudier C, Papamichael EM, Sakarellos C & Dimicoli JL. Investigation of the active center of rat pancreatic elastase. *B.B.A. (Prot Proteom)* 1989;994:64-74.
188. Bieth JG. Some Kinetic Consequences of the Tight Binding of Protein-Proteinase-Inhibitors to Proteolytic Enzymes and Their Application to the Determination of Dissociation Constants. In Bayer-Symposium V Proteinase Inhibitors. Springer-Verlag New York.1974: 463-469.
189. Faller B & Bieth JG. Kinetics of the interaction of chymotrypsin with eglin c. *Biochem J* 1991; 280:27-32.
190. Leone V, Marinelli F, Carloni P & Parrinello M. Targeting biomolecular flexibility with metadynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol* 2010; 20:148–154.
191. Branduardi D, Gervasio FL & Parrinello M. From Ato B in free energy space. *J.Chem. Phys.*2007; 126: 054-103 .
192. Bussi G, Laio A & Parrinello M. Equilibrium free energies from non-equilibrium metadynamics. *Phys. Rev. Lett.* 2006; 96: 090601.
193. Tiwary P & Parrinello M. From metadynamics to dynamics. *Phys. Rev. Lett.* 2013;111: 230602.
194. Baftizadeh F, Cossio P, Pietrucci F & Laio A. Protein Folding and Ligand-Enzyme Binding from Bias-Exchange Metadynamics Simulations. *CPC* 2012; 2:79–91.
195. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz *Ann. Phys.* 1948; 437: 55–75.

196. Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR & Weiss S. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6264-6268.
197. Deniz AA, Dahan M, Grunwell JR, Ha T, Faulhaber AE, Chemla DS, Weiss S & Schultz, PG. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Forster distance dependence and subpopulations *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3670-3675.
198. Stöckel A, Stiebitz B & Neubert K. Specific inhibitors of aminopeptidase P. Peptides and pseudopeptides of 2-hydroxy-3-amino acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 421:31-35.
199. Theodorou LG, Bieth JG, Papamichael EM. The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. *Bioresource Technology* 2007; 98:1931-1939, and references therein.
200. Kresge AJ, More O & Powell MF. Solvent isotopes effects, fractionation factors and mechanisms of proton-transfer reactions. In *Isotopes in Organic Chemistry*. Elsevier Amsterdam, 1987:177-273.
201. Stein RL, Strimpler AM, Hori H & Powers JC. Catalysis by human leukocyte elastase: proton inventory as a mechanistic probe. *BIOCHEMISTRY US* 1987; 26:1305-1314.
202. Bezeau M & Endrenyi L. Design of Experiments for the Precise Estimation of Dose-Response Parameters: the Hill Equation. *J.theor.Biol* 1986;123:415-430
203. Stergiou P-Y, Foukis A, Gkini OA, Bieth JG, Papamichael EM. Kinetic and computational analysis of the reversible inhibition of porcine pancreatic elastase: a structural and mechanistic approach *J.Enz.Inh.Med.Chem.* 2016; 31:131-139.
204. Porter CM & Miller BC. Cooperativity in Monomeric Enzymes with Single Ligand-Binding Sites. *Bioorg Chem.* 2012;43:44-50.
205. Quinn DM & Sutton LD. Theoretical Basis and Mechanistic Utility of Solvent Isotope Effects. In *Enzyme Mechanism from Isotope Effects*. CRC Press Boston, 1991:74-126.
206. Schowen RL. Mechanistic Deductions from Solvent Isotope Effects. In *Progress in Physical Organic Chemistry*. Wiley Intersciences New York, 1972:275-329.
207. Theodorou LG, Lymperopoulos K, Bieth JG & Papamichael EM. Insight into the Catalysis of Hydrolysis of four Newly Synthesized Substrates by Papain: A Proton Inventory Study. *Biochemistry-US* 2001;40:3996-4004.

208. Syrén PO. The solution of nitrogen inversion in amidases. *FEBS Journal*. 2013;280:3069-3083.
209. Scheiner S. Analysis of Catalytic Mechanism of Serine Proteases. Viability of the Ring-Flip Hypothesis. *J. Phys. Chem. B*. 2008; 112:6837-6846.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ  
ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ. MSc**

**ΣΠΟΥΔΕΣ**

- **Υποψήφια Διδάκτωρ** του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2011-παρών.
- **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα** Ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία και Ανοσοχημεία-Μικροβιακή Βιοτεχνολογία, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2011.
- **Πτυχίο Χημείας** (Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων), 2008

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ**

- ◆ Μελέτη της κινητικής ενζυμικών και ετερογενών αντιδράσεων των οποίων διερευνάται ο μηχανισμός δράσης τους και αναπτύσσεται το βέλτιστο μαθηματικό μοντέλο (εξίσωση), που τον περιγράφει.
- ◆ Πρωτεολυτικά ένζυμα και αναστολείς
- ◆ Απομόνωση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός Υδρολασών (πρωτεασών, λιπασών αμυλασών).
- ◆ Σύνθεση πεπτιδικών υποστρωμάτων
- ◆ Ενζυμική Βιοτεχνολογία.
- ◆ Επεξεργασία πειραματικών κινητικών δεδομένων με σκοπό τη χάραξη της βέλτιστης καμπύλης και τον πειραματικό σχεδιασμό.

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ**

ΕΣΠΑ 2007-2013: **ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011, Κωδ. Έργου: 11ΣΥΝ\_8\_839**  
«Αγροτοβιομηχανικά υγρά και στερεά απόβλητα ως πρώτες ύλες για την παραγωγή μιας νέας γενιάς βιοκαυσίμου»  
(«Agroindustrial liquid and solid wastes as raw materials for the production of a new generation biofuel»)

ΕΣΠΑ 2007-2013: **ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011, Κωδ. Έργου: 11ΣΥΝ\_2\_1374** «Νανο- και Μικρο- βιοτεχνολογία κυτταρίνης: Εφαρμογές σε Βιομηχανίες Τροφίμων» («Cellulose Nano- and Micro- biotechnology: Applications in Food Industries»)

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

1. A. Foukis, P-Y. Stergiou, L. G. Theodorou, M. Papagiannin and E. M. Papamichael, **“Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest”**, *Bioresource Technology*, 123 (2012) 214–220.
2. E.M. Papamichael, P-Y. Stergiou, A. Foukis, Marina Kokkinou and L.G. Theodorou, **“Effective Kinetic Methods and Tools in Investigating the Mechanism of Action of Specific Hydrolases”**, an invited contribution to *Medicinal Chemistry and Drug Design, Chapter 12* (2012), Ed. **D. Ekinci**, INTECH open science (Open Access publisher of Scientific Books and Journals) publishers, University Capmus STeP Ri, Slavaska Krautzeka 83/A, 51000 Rijeka, Croatia (ISBN 979-953-307-678-1 – <http://www.intechopen.com/books/medicinal-chemistry-and-drug-design>)
3. P-Y. Stergiou Stergiou, A. Foukis, H. Sklivaniti, P. Zacharaki, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288”**, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Online First™, 27 July 2012.
4. P-Y. Stergiou, A. Foukis, L. G. Theodorou, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Optimization of Process Variables Affecting the Production of Extracellular Protease by *Kluyveromyces marxianus*”**, *Current Biotechnology*, 2 (2013) 23-29.
5. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, **“Advances in lipase-catalyzed esterification reactions”**, *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 1846-1859.
6. P-Y. Stergiou, A. Foukis, L. G. Theodorou, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Production of Extracellular  $\alpha$ -Amylase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 optimized by response surface methodology”**, *BRAZ. ARCH. BIOL. TECHNOL.*, 57, (2014) 421-426.
7. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, **“Kinetic constraints and features imposed by the immobilization of enzymes onto solid matrices: a key to advanced biotransformations”**, *Ind. J. Experm.Biology* 52, (2014) 1045-1052.
8. Koutinas, A.A., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Kandylis, P., Pissaridi, K., Dima, A., Boura, K., Lappa, K., Tsafrakidou, P., P.-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A. Gkini, E.M. Papamichael, **“Economic evaluation of technology for a new generation biofuel production using wastes”**, *Bioresource Technology* 200, (2016) 178-185.
9. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A. Gkini, J.G. Bieth, and E.M. Papamichael, **“Kinetic and computational analysis of the reversible inhibition of porcine**

- pancreatic elastase: a structural and mechanistic approach**", *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(S3) (2016) 131-139.
10. Athanasios Foukis, Olga A. Gkini, Panagiota-Yiolanda Stergiou, Vasilios A. Sakkas, Agapi Dima, Konstantina Boura, Athanasios Koutinas, Emmanuel M. Papamichael. **Sustainable production of a new generation biofuel by lipase-catalyzed esterification of fatty acids from liquid industrial waste biomass.** *Bioresource Technology*. (2017), 238, 122–128
  11. Agapi Dima, Konstantina Boura, Argyro Bekatorou, Panagiota-Yiolanda Stergiou, Athanasios Foukis, Olga A. Gkini, Panagiotis Kandyliis, Katerina Pissaridi, Maria Kanellaki, Emmanuel M. Papamichael, Athanasios A. Koutinas. **Scale-up for esters production from straw whiskers for biofuel applications.** *Bioresource Technology*. (2017), xxx, xxx–xxx

#### ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. P-Y. Stergiou, A. Foukis. L.G. Theodorou, and E.M. Papamichael, **“PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASES FROM *Kluyveromyces Marxianus* IFO 0288”**, INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOPROCESSES IN FOOD INDUSTRIES, (2010), October 5-8, Curitiba - BRAZIL
2. E.M. Papamichael, A. Foukis, M. Kokkinou, P-Y Stergiou, and L.G. Theodorou, **"Investigation of the mechanism of action of proteases and lipases: biotechnological aspects and applications"**, International Conference on New Horizons in Biotechnology, (2011), November 21-24, Trivandrum - India
3. E.M. Papamichael, A. Foukis, M. Kokkinou, H Sklivaniti, P-Y Stergiou, L.G. Theodorou, **"Induction and optimization of culture conditions of yeast *Kluyveromyces marxianus* - IFO-0288: Production of extracellular Hydrolases"**, International Conference on New Horizons in Biotechnology, (2011), November 21-24, Trivandrum - India: [POSTER Presentation]
4. P-Yiolanda Stergiou, A. Foukis, H. Sklivaniti, P. Zacharaki, L. G. Theodorou, M. Papagianni, E. M. Papamichael, **“Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular hydrolases with protease, lipase and  $\alpha$ -amylase activities by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288”**, IFIB-2012, 5<sup>th</sup> International Conference on Industrial Bioprocesses (2012), October 7-11, Taipei, Taiwan: [ORAL Presentation]
5. M. Papagianni, E. M. Papamichael, **“Influence of the type of carbon source and other nutritional parameters on weisselin A production by *Weissella paramesenteroides* DX”**, IFIB-2012, 5<sup>th</sup> International Conference on Industrial Bioprocesses (2012), October 7-11, Taipei, Taiwan: [POSTER Presentation]
6. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, **“The nature of pH-value in multiphasic reaction media: its influence in enzyme nanotechnology”**, Bio-Sangam-2013, (2013), International Conference

- on Environment, Health and Industrial Biotechnology, November 21-23, Allahabad, India: **[ORAL Presentation]**
7. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**Analysis of immobilized enzymes kinetic data**”, Bio-Sangam-2013, (2013), International Conference on Environment, Health and Industrial Biotechnology, November 21-23, Allahabad, India: **[POSTER Presentation]**.
  8. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**Effective Concepts in Lipase-Catalyzed Esterification Reactions**”, ICABB-2013, (2013), International Conference on Advances in Biotechnology and Bioinformatics, & X Convention of the BRSI, November 25-27, PUNE, India: **[ORAL Presentation]**
  9. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**Kinetic constraints and features imposed by the immobilization of enzymes onto solid matrices: a key to advanced biotransformations**”, ICABB-2013, (2013), International Conference on Advances in Biotechnology and Bioinformatics, & X Convention of the BRSI, November 25-27, PUNE, India: **[POSTER Presentation]**
  10. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, D. Noutsopoulos, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**Synthesis of novel rennin substrates and development of innovative enzymatic assay methods**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[ORAL Presentation]**
  11. E. Karabika, M. Filippou, A. Foukis, P-Y. Stergiou, D. Noutsopoulos, M. Parapouli, A. Afendra, E. Hatziloukas, E. M. Papamichael, “**Immobilization of grapevine indigenous strains in cellulose nano-tubes, for the production of high quality wines**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[POSTER Presentation]**
  12. O. Gkini, A. Foukis, P-Y. Stergiou, P. V. Ioannou. E. M. Papamichael, “**Specific hydrolysis effects of porcine pancreatic lipase on di-, tri- and tetra-acyl erythritols**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[POSTER Presentation]**
  13. M. Parapouli, M. Koukouritaki, A. Foukis, P-Y. Stergiou, E. Karabika, E. M. Papamichael, A. Afendra, E. Hatziloukas “**Partial characterization of bacterial strains possessing lipase activity isolated from waste treatment facilities of Volos and Psittaleia (Greece)**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[POSTER Presentation]**



14. E. M. Papamichael, M. Koukouritaki, A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Parapouli, A. Afendra, E. Hatziloukas, “**Aspects in the catalytic synthesis of fatty acid esters, as biofuel alternatives, by native and/or genetically improved**
15. **microbial lipases**”, ICETB 2014, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology (2014), November 6-9, New Delhi, India: [**ORAL Presentation**]
16. M. Parapouli, A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Koukouritaki, E. Karabika, E. M. Papamichael, A. Afendra, E. Hatziloukas, “ **Cloning and overexpression of a new lip gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Psi-1 - purification and partial characterization of the recombinant lipase**”, 6<sup>th</sup> Congress on European Microbiologists (2015), June 7-11, Maastricht, The Netherlands: [**POSTER Presentation**].
17. M. Filippou, E. Karabika, M. Kallis, E. Troianou, M. Parapouli, P-Y. Stergiou, A. Foukis, D. Noutsopoulos, A. Afendra, E. M. Papamichael, E. Hatziloukas, “ **Comparative study of fermentation processes by free and immobilized grapevine indigenous strains for the production of high quality wines** ”, 6<sup>th</sup> Congress on European Microbiologists (2015), June 7-11, Maastricht, The Netherlands: [**POSTER Presentation**].
18. A. Foukis, P-Y. Stergiou, O. Gkini, V. A. Sakkas, M. Parapouli, M. Koukouritaki, A. Afendra, E. Hatziloukas, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**PRODUCTION OF A NEW GENERATION BIOFUEL FROM AGROINDUSTRIAL LIQUID AND SOLID WASTES**”, BIOTRANS 2015, (2015), July 26-30, Vienna, Austria: [**POSTER Presentation**].
19. A. Foukis, P-Y. Stergiou, O. Gkini, V. A. Sakkas, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**THE AMBIGUOUS KINETICS IN THE CASE OF LIPASE-CATALYZED ESTERIFICATION REACTIONS: A KEY TO THE ADVANCED BIOTRANSFORMATIONS**”, BIOTRANS 2015, (2015), July 26-30, Vienna, Austria: [**POSTER Presentation**].
20. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A.Gkini, and E.M. Papamichael, “**Biotechnological applications of proteolytic enzymes: Mechanism of the reversible inhibition of porcine pancreatic Elastase**”, New Horizons in Biotechnology, November 22-25, 2015 Trivandrum, India: [**Poster Presentation**].
21. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O. Gkini, T. Petsi, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, A. Koutinas, E.M. Papamichael (2015) “**Development of innovative assay methods for rennin, in free and in immobilized form on cellulose nanotubes: Synthesis of novel peptide substrates**”, New Horizons in Biotechnology, November 22-25, 2015 Trivandrum, India: [**Oral Presentation**].
22. E. M. Papamichael, A. Foukis, O.A.Gkini, P-Y. Stergiou, V. A. Sakkas, A.A. Koutinas and A. Pandey, “**Lipase Catalyzed Esterification of Fatty acids from Industrial Wastes for Biofuel Production**”, BPI-2016, (2016), December 15-17, CIAB-Mohali, India: [**Oral Presentation**].
23. E. M. Papamichael, P-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A.Gkini, and A. Pandey, “**Advances of Enzyme Immobilization on cellulose nanoparticles**”, ICSEPM-2016, (2016), December 11-13, JNU-Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India: [**Oral Presentation**].

24. E. M. Papamichael, A. Foukis, O.A.Gkini, P-Y. Stergiou, V. A. Sakkas, A.A. Koutinas and A. Pandey, “**Lipase- assisted production of Biofuel from**  
25. **Industrial wastes from ethanol distilleries**”, ICCB-2016, (2016), December 8-10, Vellore, VIT-University, Vellore, TN- India: [**Oral Presentation**].

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

**Αγγλικά:** First Certificate in English, University of Cambridge

**Γαλλικά:** Diplome d’Etudes en Langue Francaise Delf A1, A2, A3, A4

### ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

WINDOWS, MICROSOFT WORD, MICROSOFT EXCEL, MICROSOFT ACCESS, MICROSOFT POWERPOINT, INTERNET EXPLORER-MICROSOFT OUTLOOK

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**Ιούλιος-Αύγουστος 2004:** Πρακτική άσκηση στην Γενική Μεταλλευτική & Μεταλλουργική Ανώνυμος Εταιρεία ΛΑΡΚΟ.

**Ιούλιος-Αύγουστος 2003:** Συμμετοχή σε πρακτική άσκηση στην Ανώνυμο Βιομηχανική & Εμπορική Εταιρεία Επεξεργασίας & Βιομηχανοποίησης Ελαιωδών Σπόρων & Ναυτιλίας, ΣΟΓΙΑ ΕΛΛΑΣ Α.Ε.

### ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΛΛΟΓΩΝ

1. Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών
2. Μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας