

Σταματίας Κ. Τσίγκα

Χημικού

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ  
ΤΗΣ ΚΟΛΛΑΓΕΝΑΣΗΣ *Clostridium histolyticum*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

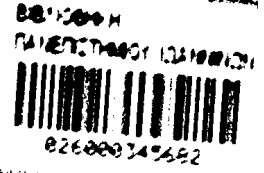
Τμήμα Χημείας

Παν/μίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1988



224932



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΑΣ  
Ι Ρ Α Ν Ν Ι Ω Ν  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΣΧΟΛΕΙΩΝ  
ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ  
Τ.Π. (2001) 02001 - 02004  
Πάτρα, 11 Νοεμβρίου 2008

Προς:  
το Ίδρυμα Χημείας  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Από: "Ινστιτούτο Χημείας του Α.Π.Θ."  
για την υποβολή Τσίγκα

Σήμερα στις 11 Νοεμβρίου 2008 έγινε η δημόσια ανακοίνωση της ερευνητικής διατριβής με θέμα:  
"Σύνθεση και κινητική μελέτη της αποδόσεως της κολλοειδούς Clostridium histolyticum", από την ομότιμη Διδασκόμενη κ. Σταυρούλα Τσίγκα και τη συνομότιμη Ακούσια σχετικά ομότιμη κ. Ευαγγελία. Εν συνέχεια έγινε σύσκεψη της Εξεταστικής Επιτροπής και αποφασίστηκε να γίνει η υπαγωγή του τίτλου του Διδακτορικού από το Ίδρυμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κ. Σταυρούλα Τσίγκα με βάση Αρ.Πρωτ. 11/2008.

Πρόεδρος της Εξεταστικής Επιτροπής

*[Signature]*  
Κωνσταντίνος Τσακάλιανος, Αποκρίτης

*[Signature]*  
Απόστολος Καραβάνης, Αποκρίτης Κοσμητικής

*[Signature]*  
Μαρία Σακελλίου-Βασιλείου, Επίκουρος Καθηγήτρια

*[Signature]*  
Μαρία Τζαμαράνη, Επίκουρος Καθηγήτρια

*[Signature]*  
Απόστολος Τσακάλιανος, Επίκουρος Καθηγητής





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
451 10 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Αριθμός Πρωτ. ... 4.4.8  
Ημερομηνία 1.4.11.88

Ιωάννινα 11 Νοεμβρίου 1988

Τηλ. (0651) 92203 - 92204

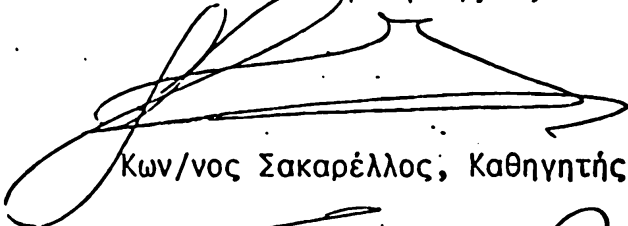
Προς  
το Τμήμα Χημείας  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

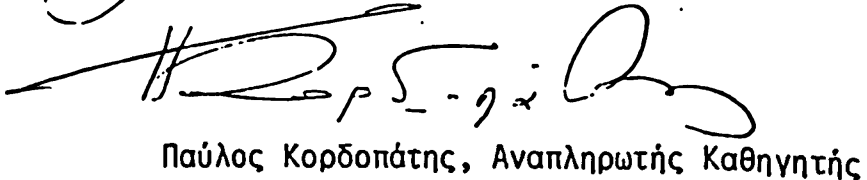
Θέμα: "Απονομή του τίτλου του Διδάκτορα  
στην κ. Σταματία Τσίγκα".

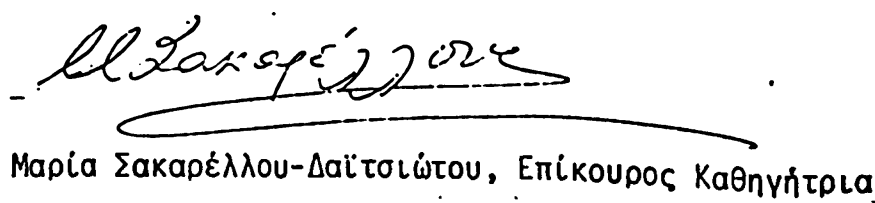
Σήμερα στις 11 Νοεμβρίου 1988 έγινε η Δημοσία παρουσίαση της Διδακτορικής Διατριβής με θέμα:

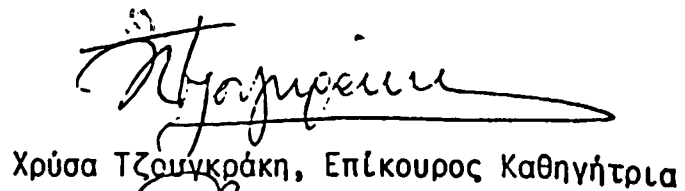
"Σύνθεση και Κινητικές Μελέτες Αναστολέων της Κολλαγενάσης Clostridium histolyticum", από την υποψήφια διδάκτορα κ. Σταματία Τσίγκα και επακολούθησε σχετική συζήτηση με την υποψήφια. Εν συνεχεία έγινε σύσκεψη της Εξεταστικής Επιτροπής και αποφασίσθηκε να γίνει η απονομή του τίτλου του Διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κ. Σταματία Τσίγκα με βαθμό Άριστα.

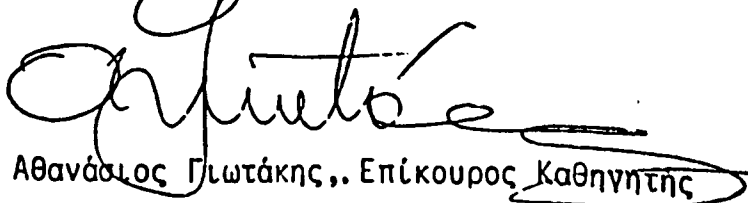
Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

  
Κων/νος Σακαρέλλος, Καθηγητής

  
Πάυλος Κορδοπάτης, Αναπληρωτής Καθηγητής

  
Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Επίκουρος Καθηγήτρια

  
Χρύσα Τζουγκράκη, Επίκουρος Καθηγήτρια

  
Αθανάσιος Γιωτάκης, Επίκουρος Καθηγητής



Σταματίας Κ. Τσίγκα

Χημικού

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ  
ΤΗΣ ΚΟΛΛΑΓΕΝΑΣΗΣ *Clostridium histolyticum*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τμήμα Χημείας

Παν/μίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1986



Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (N. 5343/1932, άρθρο 202).



ΕΠΙΧΡΕΣΗ

Η εισαγωγή αυτή έγινε στο Πανεπιστήμιο Θεολογίας Κωνσταντινούπολης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τη Γραμματεία Νομικού 1907-08 υπό την καθοδήγηση του κ. Γεωργίου Κωνσταντίνου, ο οποίος αποστέλλεται από τον κ. Γεωργίου Κωνσταντίνου, Συνοικισμός της Αθήνας, επί Βασιλειούσσης Καθίστη και του Βασιλειούσσης Καθίστητος κ. Μαρία Αλεξοπούλου Καθηγήτρια και του Βασιλειούσσης Καθίστητος κ. Μαρία Αλεξοπούλου Καθηγήτρια και του Βασιλειούσσης Καθίστητος κ. Μαρία Αλεξοπούλου Καθηγήτρια.

Το όνομα αυτής της διατριβής μεταφέρθηκε από τον κ. Γεωργίου Κωνσταντίνου Σακελλάκη των οποίων ημερομηνία έφερε για τη συνεχή καθύληση, προσεχώς και επεξεργασμένη κατά τη διατριβή αυτή της εισαγωγής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την Επικύρια Καθηγήτρια κ. Μαρία Αλεξοπούλου-Σακελλάκη για τη συνεχή συμπλοκή και την οικονομική βοήθεια της τόσο κατά τη διάρκεια της περιστασιακής εργασίας μου και στη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Επίσης θερμά ευχαριστώ τον Επικύριο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Γιωτόπουλο για τις εύστοχες παρατηρήσεις του με τις οποίες τη βελτίωση αυτής της εργασίας.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου Παναγιώτη και τον Μαθηματικό κ. Τριμπελά για την οικονομική βοήθεια της και η μαθηματική επεξεργασία με Η/Υ των παραπάνω κειμένων σύμφωνα με τις προτάσεις μου.

Στους γονείς μου

Ευχαριστώ επίσης τον Επιβουλή και Γραμματέα του Βιολογικού κ. Σημάκη της Γραμματείας Γραμμάτων του Παν/μίου Ιωαννίνων Καθηγητή κ. Ορέστη Τσόλα καθώς και τους συνεργάτες του, για τις βελτιώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της παρασκευής του εσωτερικού τμήματος του Ηρακλείου τους.

Ευχαριστώ τέλος την φίλη μου Επικύρια κ. Γεωργία Κολοκοτρώνη για την προσεχώς διατριβή του κειμένου.

Η εισαγωγή αυτή γράφτηκε μερικώς στο Πανεπιστήμιο Θεολογίας Κωνσταντινούπολης, από τη Γραμματεία Νομικού Κωνσταντίνου και την Ευρωπαϊκή Διεπιστημονική Κοινότητα (Επιστημονική Επιτροπή 5720-015). Επιβουλή Κωνσταντίνου.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την χρονική περίοδο 1985-88 υπό την καθοδήγηση τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής η οποία αποτελείται από τον Καθηγητή κ.Κωνσταντίνο Σακαρέλλο ως Επιβλέποντα Καθηγητή και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Μαρία Δαΐτσιώτου-Σακαρέλλου και κ. Αθανάσιο Γιωτάκη.

Το θέμα αυτής της διατριβής προτάθηκε από τον Καθηγητή κ.Κωνσταντίνο Σακαρέλλο τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή καθοδήγηση, παρακολούθηση και ενθάρρυνση κατά τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κ.Μαρία Δαΐτσιώτου-Σακαρέλλου, για τη συνεχή συμπαράσταση και την ουσιαστική βοήθειά της, τόσο κατά τη διεξαγωγή όλης της πειραματικής εργασίας όσο και στη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Επίσης θερμά ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ.Αθανάσιο Γιωτάκη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του, με αποτέλεσμα τη βελτίωση αυτής της εργασίας.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στον Λέκτορα κ.Μανώλη Παπαμιχαήλ και τον Μαθηματικό-Προγραμματιστή Η/Υ κ.Κων/νο Τρεμπέλη για την ουσιαστική βοήθειά τους στη μαθηματική επεξεργασία σε Η/Υ των πειραματικών δεδομένων της διατριβής μου.

Ευχαριστώ επίσης τον διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, Καθηγητή κ.Ορέστη Τσόλα, καθώς και τους συνεργάτες του, για τις διευκολύνσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της χρησιμοποίησης του φασματοφωτόμετρου του Εργαστηρίου τους.

Ευχαριστώ τέλος την φίλη μου παρασκευάστρια κ.Γεωργία Κολοκούρη για την προσεχμένη δακτυλογράφηση του κειμένου.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε μερικώς από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τη Γενική Γραμματεία Ερευνας και Τεχνολογίας και την Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα (Ερευνητικό Πρόγραμμα ST2J-0184, Stimulation Action).

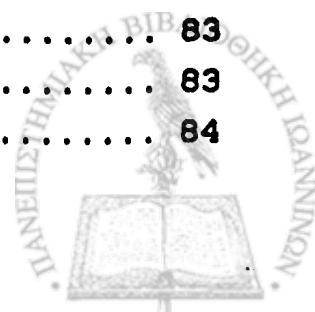




I.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
I.1.	Η σημασία των ενζύμων στο κύτταρο .....	1
I.2.	Ο ρόλος των ενζύμων στην αυτορύθμιση της κυτταρικής δραστικότητας .....	2
I.3.	Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζύμων .....	3
I.3.1.	Τα ένζυμα στη Χημειοθεραπεία και Κλινική Χημεία ...	3
I.3.2.	Τα ένζυμα στη Χημική βιομηχανία .....	4
I.3.3.	Τα ένζυμα στη διαφοροποίηση και εξέλιξη .....	5
I.4.	Ονοματολογία και ταξινόμηση των ενζύμων .....	5
I.5.	Σκοπός αυτής της εργασίας .....	7
II.	ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ .....	11
II.1.	Επιτάχυνση μιας αντίδρασης .....	11
II.2.	Πραγματοποίηση μιας μη θερμοδυναμικά ευνοϊκής αντι- δρασης .....	12
III.	ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΩΣ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ - ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ - ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ - ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΜΠΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ....	15
III.1.	Δεσμοί υδρογόνου - Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις .....	17
III.2.	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις - Δυνάμεις Van der Waals .....	21
III.3.	Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας .....	23
III.4.	Τεταρτοταγής και Πεμπτοταγής δομή των ενζύμων .....	24
III.5.	Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση του πρωτεϊ- νικού μορίου .....	27
IV.	ΔΟΜΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ .....	29
IV.1.1.	Σημεία σύνδεσης του ενζύμου .....	29
IV.1.2.	Συμπαράγοντες - Προσθετικές ομάδες .....	31
IV.2.	Ανίχνευση και χαρακτηρισμός των σημείων σύνδεσης του ενζύμου, .....	33
IV.2.1.	Φωτομετρικές μέθοδοι .....	33
IV.2.2.	Μέθοδοι με ηλεκτρόδια .....	34
IV.2.3.	Χημικές τροποποιήσεις .....	34



IV.3.	Σήμανση λόγω συγγένειας (Affinity labelling) ....	36
IV.4.	Επαγωγικό φαινόμενο .....	37
IV.5.	Ενεργό κέντρο και αλλοστερικά σημεία σύνδεσης ...	39
IV.6.	Εξειδίκευση .....	41
V.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ .....	43
V.1.	Ενζυμικές αντιδράσεις ενός υποστρώματος. Εξίσωση Michaelis-Menten .....	43
V.2.	Μέθοδοι γραφικής απεικόνισης ενζυμικών κινητικών δεδομένων .....	47
V.2.1.	Γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk .....	47
V.2.2.	Γραφική παράσταση των Hanes-Woolf .....	48
V.2.3.	Γραφική παράσταση των Woolf-Augustisson-Hofstee .	49
V.2.4.	Γραφική παράσταση των Eadie-Scatchard .....	50
V.2.5.	Περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος .....	51
V.3.1.	Επίδραση του pH στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων .....	51
V.3.2.	Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων .....	52
VI.	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ .....	54
VI.1.	Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition) .	54
VI.2.	Μη συναγωνιστική αναστολή (Non competitive inhibition) .....	60
VI.3.	Ανταγωνιστική αναστολή (Uncompetitive inhibition) .	64
VI.4.	Σχεδιασμός Αναστολέων .....	67
VII.	ΚΟΛΛΑΓΕΝΑΣΕΣ .....	70
VII.1.	Απομόνωση - Καθαρισμός - Υποστρώματα .....	71
VII.2.	Οι κολλαγενάσες ως μεταλλοένζυμα .....	75
VII.3.	Πρόσφατα αποτελέσματα αναστολέων κολλαγενάσης ...	77
VIII.	ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ .....	83
VIII.1.	Εισαγωγή - Γενικές αρχές .....	83
VIII.2.	Τα στάδια της πεπτιδικής σύνθεσης .....	84



VIII.3.	Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα .....	85
VIII.4.	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση .....	87
VIII.5.	Προβλήματα ρακεμοποίησης κατά την πεπτιδική σύνθεση .....	90
VIII.6.	Retro - Inverso πεπτιδία .....	91
IX.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ .....	96
IX.1.	Διαγραμματική πορεία σύνθεσης πεπτιδικών αναστο- λέων σε υγρή και στερεή φάση .....	96
IX.1.1.	Γενικό σεδιάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση	96
IX.1.2.	Γενικό σχεδιάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση .....	100
IX.2.	Προσδιορισμός των SH ομάδων της κυστεΐνης .....	104
IX.3.	Σύνθεση πεπτιδικών αναστολέων .....	106
IX.4.	Γενική αρχή φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού των Km και Ki της Clostridium κολλαγενάσης .....	120
X.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΘΕΝΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ .....	124
X.1.	Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων Km και Vmax.	124
X.2.	Προσδιορισμός των σταθερών αναστολής Ki .....	134
XI.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	165
XII.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	169
XIII.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	173



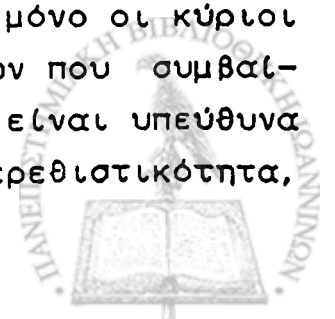
## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### I.1. Η σημασία των ενζύμων στο κύτταρο

Το κύτταρο ανεξάρτητα από τη μορφή του, είναι η απλούστερη μονάδα ζωής. Παρά τη μεγάλη ποικιλία των κυττάρων όλα έχουν την ίδια βασική δομή: κυτταρική μεμβράνη, κυτόπλασμα, πυρήνας, ριβοσώματα, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, συσκευή Golgi κλπ. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από ένα στρώμα λιπιδίων ανάμεσα σε στρώματα πρωτεΐνης. Η βασική λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης δεν είναι ο στεγανός αποκλεισμός του κυττάρου από το περιβάλλον του, αλλά η εκλεκτική και ρυθμιζόμενη διακίνηση μορίων ή ιόντων μέσω αυτής. Για να πραγματοποιηθεί η απαραίτητη εκλεκτική λειτουργία των μεμβρανών απαιτούνται κατάλληλοι μηχανισμοί βάσει των οποίων αφ' ενός μεν αναγνωρίζονται μόνο εκείνα τα συστατικά που μπορούν να την διαπερνούν, αφ' ετέρου δε υποβοηθείται η μεταφορά τους προς τη σωστή κατεύθυνση. Το είδος των πρωτεϊνών και των λιποειδών καθώς και η κατανομή τους μέσα στη κυτταρική μεμβράνη χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση ώστε να μπορούν να επιτευχθούν όλες οι απαιτούμενες ειδικές λειτουργίες του κυττάρου.

Όλα τα κύτταρα αξιοποιούν μέρος των θρεπτικών υλικών που τους προσφέρονται ως τροφή και παράχουν την απαιτούμενη ενέργεια, που στη συνέχεια τη χρησιμοποιούν για να αφομοιώσουν το υπόλοιπο μέρος της τροφής τους με σκοπό να συντηρηθούν και να αυξηθούν. Είναι επίσης γενικά παραδεκτό ότι το εσωτερικό μέρος του κυττάρου χαρακτηρίζεται από σταθερότητα, για τη διατήρηση της οποίας απαιτείται επαναληψιμότητα και ακρίβεια σε όλες τις χημικές διεργασίες. Η γρήγορη ροή ύλης και ενέργειας μέσα από τους ζωντανούς οργανισμούς με σύγχρονη διατήρηση σταθερής χημικής σύστασης αποτελεί το κύριο γνώρισμα της ζωής.

Τα ένζυμα συμμετέχουν στην όλη πορεία ανταλλαγής ύλης και ενέργειας μεταξύ κυττάρου και περιβάλλοντος, με προκαθορισμένο και ελεγχόμενο ρυθμό. Τα ένζυμα δεν είναι μόνο οι κύριοι συντελεστές των περισσότερων χημικών μεταβολών που συμβαίνουν στους ζωντανούς οργανισμούς, αλλά επιπλέον είναι υπεύθυνα για πολλά άλλα χαρακτηριστικά της ζωής, όπως η ερεθιστικότητα,



η κίνηση, ο αυτοδιπλασιασμός των κυττάρων κ.λ.π. Μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί πολλές εκατοντάδες ενζύμων και έχει διαπιστωθεί ότι όλα είναι μεγαλομόρια πρωτεϊνικής φύσης και πολύπλοκης δομής. Τέλος δεν θα ήταν υπερβολή να λεχθεί πως οι μεγάλες ανακαλύψεις της σύγχρονης βιοχημείας, οφείλονται στη μελέτη και κατανόηση του δυναμικού ρόλου των ενζύμων στο σύνολο των λειτουργιών της ζωής.

### I. 2. Ο ρόλος των ενζύμων στην αυτορύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας

Η αυτορυθμιστική ικανότητα των λειτουργιών του μεταβολισμού που είναι η θεμελιώδης λειτουργία της ζωής, είναι αποτέλεσμα διαφόρων μηχανισμών, οι οποίοι αναφέρονται είτε σε μοριακό επίπεδο είτε σε επίπεδο ενδοκυτταρικής οργάνωσης. Η όλη οργάνωση του κυττάρου, επιτρέπει τον ελεγχόμενο μεταβολισμό με τη βοήθεια πολυενζυμικών συστημάτων, όπου είναι δυνατή η αλληλοεξάρτηση δύο ή περισσότερων διαδοχικών αντιδράσεων ώστε να πετυχαίνεται καλύτερα ο ακριβέστερος έλεγχος της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να επιβραδυνθεί μεταξύ των άλλων είτε με μεταβολή του pH, όταν και όπου αυτό είναι δυνατό, είτε λόγω δράσης ενός μορίου αναστολέα. Ένας σημαντικός τύπος αναστολής που έχει διαπιστωθεί σε πολλούς μεταβολικούς δρόμους είναι η αναστολή που προέρχεται από τελικό προϊόν (feed-back)<sup>1</sup>. Σ' αυτό το είδος αναστολής κάποιο τελικό προϊόν μιας σειράς διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων, είναι ειδικός αναστολέας του ενζύμου που καταλύει την πρώτη αντίδραση στη σειρά. Η αναστολή επιτυγχάνεται ή με μεταβολή της ποσότητας του ενζύμου μέσω γενετικού ελέγχου στο ρυθμό της σύνθεσής του, ή με μεταβολή της καταλυτικής του δραστηριότητας. Τέλος, η υπάρχουσα εξειδίκευση των ενζύμων και η επιπλέον δυνατότητα διαφοροποίησης αυτής από την ύπαρξη διαφορετικών συνενζύμων, στη διάρκεια αναβολικών και καταβολικών αντιδράσεων, έχουν ως αποτέλεσμα να επικρατεί κάθε στιγμή πλήρης εναρμονισμός μεταξύ αναβολισμού



και καταβολισμού ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του κυττάρου.

### I. 3. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζύμων

Από το 1833, που οι Payen και Persoz διαπίστωσαν ότι η αμυλάση διασπά το άμυλο, μέχρι σήμερα, η ανθρωπότητα είδε μία σταδιακή αλλά με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό εισαγωγή των ενζύμων στη Τεχνολογία. Σήμερα παρασκευάζονται ένζυμα σε βιομηχανική κλίμακα για να χρησιμοποιηθούν είτε απ'ευθείας από τον καταναλωτή, είτε ως καταλύτες για την παρασκευή διαφόρων βιομηχανικών προϊόντων, είτε και ως μέσα για βιοϊατρικές αναλύσεις.

Στη συνέχεια αναφέρονται μερικές από τις πλέον επίκαιρες εφαρμογές στη χρήση των ενζύμων. Παράλληλα αποδεικνύεται ο ρόλος "κλειδί" των ενζύμων, στη δημιουργία, διατήρηση και βελτίωση των συνθηκών ζωής κάθε ζωντανού οργανισμού

#### I. 3.1. Τα ένζυμα στη Χημειοθεραπεία και Κλινική Χημεία

Η όλη οργάνωση του κυττάρου στηρίζεται σε μία τόσο λεπτή ισορροπία αυτορυθμιζόμενου συστήματος, ώστε πολύ εύκολα μπορεί να διαταραχθεί. Ενώ κατευθυνόμενο "βιοχημικό κλειδί" που αποβλέπει σε ένα ειδικό κύτταρο μπορεί γρήγορα να διατράξει την ομαλή λειτουργία αυτού.

Η φαρμακευτική βιομηχανία βρίσκεται σε μια συνεχή εξέλιξη εφ'όσον όλο και περισσότερο νέα φάρμακα ανακαλύπτονται. Σ' αυτή την αλματώδη ανάπτυξη έχει συμβάλει σημαντικά η μελέτη των ενζυμικών συστημάτων των παθογόνων μικροοργανισμών, και η άποψη ότι κάποια τροποποίηση αυτών κάλλιστα μπορεί να επιφέρει αδρανοποίηση του μικροβίου. Αυτή όμως η λογική προσέγγισης απαιτεί, αφ'ενός μεν πλήρη κατανόηση της μεταβολικής πορείας των μικροοργανισμών και των ειδικών μικροβιολογικών ενζύμων που τις καταλύουν, αφ'ετέρου δε πλήρη διευκρίνιση των διαφορών μεταξύ του μικροβιολογικού και ανθρώπινου συστήματος.



Στη Χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται σήμερα ενώσεις οι οποίες ενώ δρουν στα ένζυμα-στόχους αφήνουν ανεπηρέαστο τον ανθρώπινο οργανισμό. Προς αυτή την κατεύθυνση σημαντική βοήθεια έχει προσφέρει η χημική συμπεριφορά των ίδιων των μικροβίων. Έχουν έτσι ανακαλυφθεί μικρόβια, όπως οι ακτινομύκητες, που συνθέτουν και εκκρίνουν ουσίες με αντιβακτηριδιακή δράση. Επίσης η ανακάλυψη και εφαρμογή των "μικροκάψουλων των ενζύμων" έχει συνεισφέρει σημαντικά στην αντιμετώπιση καρκινογόνων ασθενειών, όπως η περίπτωση της λευχαιμίας<sup>2</sup>.

Τέλος, στην Κλινική Χημεία χρησιμοποιούνται ευρέως τα ένζυμα σαν μέσα για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων μεταβολιτών σε παθολογικές καταστάσεις όπως π.χ. η οξειδάση της γλυκόζης για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και η ουριάση για τον προσδιορισμό της ουρίας. Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί πολλές δεκάδες ενζύμων που βρίσκονται στα φυσιολογικά υγρά του ανθρώπου, όπως π.χ. στο αίμα, και που τα επίπεδά τους επηρεάζονται από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με αποτέλεσμα ο κλάδος της Κλινικής ενζυμολογίας να αναπτύσσεται ταχύτατα.

### 1. 3.2. Τα ένζυμα στη Χημική βιομηχανία

Η μελέτη και οι εφαρμογές των ενζύμων τα τελευταία χρόνια έχουν επιφέρει επανάσταση στη χημική βιομηχανία. Έτσι με την εφαρμογή στη βιομηχανία μιας νέας τεχνικής, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιομηχανικοί καταλύτες. Η τεχνική αυτή είναι η καθύλωση ενζύμων σε δυσδιάλυτους φορείς, που έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα επανειλημμένης χρησιμοποίησης του ενζυμικού παρασκευάσματος, ώστε να μειώνεται το κόστος παραγωγής. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα εφαρμογής αυτής της τεχνικής είναι η παραγωγή μπύρας : η ζύμωση δεν γίνεται πλέον σύμφωνα με την κλασική μέθοδο σε δόσεις, αλλά με την μέθοδο της συνεχούς ροής κατά την οποία το μίγμα της αντίδρασης περνά μέσα από μία στήλη που περιέχει τα ένζυμα της αλκοολικής ζύμωσης προσκολλημένα πάνω σε P.V.C.



### I. 3.3. Τα ένζυμα στη διαφοροποίηση και εξέλιξη

Μια από τις σημαντικότερες απόψεις της σύγχρονης Βιολογίας είναι αυτή που αναφέρεται στη διαφοροποίηση του κυττάρου. Με αυτό τον όρο εννοούμε την πορεία κατά την οποία ένα είδος κυττάρου διαιρείται και παράγει τα θυγατρικά κύτταρα, τα οποία συγκρινόμενα με το μητρικό διαφέρουν στη δομή, στη μοριακή σύσταση και στη βιολογική λειτουργία. Αυτό το φαινόμενο συναντάται τόσο στους ζώϊκούς όσο και στους φυτικούς οργανισμούς. Κλασικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του καρότου όπου η παραγωγή ολόκληρου του φυτού προέρχεται από ένα και μόνο σωματικό κύτταρο αυτού. Αυτό σημαίνει ότι ένα απλό κύτταρο περιέχει όλο το γενετικό υλικό του οργανισμού.

Συστηματικές μελέτες που έχουν γίνει κατά την πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων, έχουν αποδείξει ότι ένας αριθμός ενζύμων δεν συνθέτονται, όταν για κάποια αιτία δεν μεταβιβασθεί η απαιτούμενη πληροφορία για τη σύνθεσή τους. Η αιτία αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην απουσία κάποιου εξωτερικού ερεθίσματος, είτε σε ένα εσωτερικό προγραμματισμό. Έτσι άλλα ένζυμα δημιουργούνται και άλλα όχι. Η όλη αλλαγή που τελικά προκύπτει στο σύνολο των υπάρχοντων ενζύμων, ισοδυναμεί με διαφορετική εσωτερική οργάνωση και διαφοροποίηση των κυττάρων.

### I. 4. Ταξινόμηση και ονοματολογία των ενζύμων

Η κοινή ονομασία των περισσότερων ενζύμων προήλθε από την προσθήκη της κατάληξης -αση στο όνομα του υποστρώματος, π.χ. το ένζυμο ουρέαση που δρα πάνω στην ουρία. Ο τρόπος αυτός της ονοματολογίας είναι βασικά εμπειρικός και καθόλου συστηματικός. Σε αρκετές περιπτώσεις πολλά από τα εμπειρικά ονόματα δεν έχουν καμμία σχέση ούτε με το υπόστρωμα, ούτε με τον τύπο της αντίδρασης που καταλύεται. Για αυτούς τους λόγους, η επιτροπή ενζύμων της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας καθιέρωσε τη συστηματική ταξινόμηση και ονοματολογία των ενζύμων. Σύμφωνα





με την ταξινόμηση αυτή τα ένζυμα χωρίζονται σε κατηγορίες και ομάδες όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οι έξι κατηγορίες των ενζύμων και οι κυριότερες ομάδες αυτών.

1. Οξειδοαναγωγάσες	2. Τρανσφεράσες	3. Υδρολάσες
Αφυδρογονάσες Οξειδάσες Υπεροξειδάσες Υδροξυλάσες Οξυγονάσες	Μεθυλτρανσφεράσες Τρανσαλδολάσες Τρανοκετολάσες Ακυλτρανσφεράσες Γλυκοσυλτρανσφεράσες Τρανσαμινάσες Κινάσες	Εστεράσες Φωσφατάσες Γλυκοσιδάσες Πεπτιδάσες Πυροφωσφατάσες
4. Λυάσες	5. Ισομεράσες	6. Λιγάσες (Συνθετάσες)
Καρβοξυλάσες Αλδεΰδολάσες Κετοξυλυάσες Υδρολυάσες Αμμωνιολυάσες	Ρακεμάσες Επιμεράσες Ενδομοριακές τραν- σφεράσες Ενδομοριακές λυάσεις Ενδομοριακές οξειδο- αναγωγάσες	Συνθετάσες αμιδίων Συνθετάσες πεπτι- δίων Κυκλολιγάσες Λιγάσες οξέων - θειολών

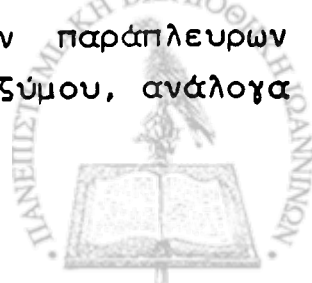


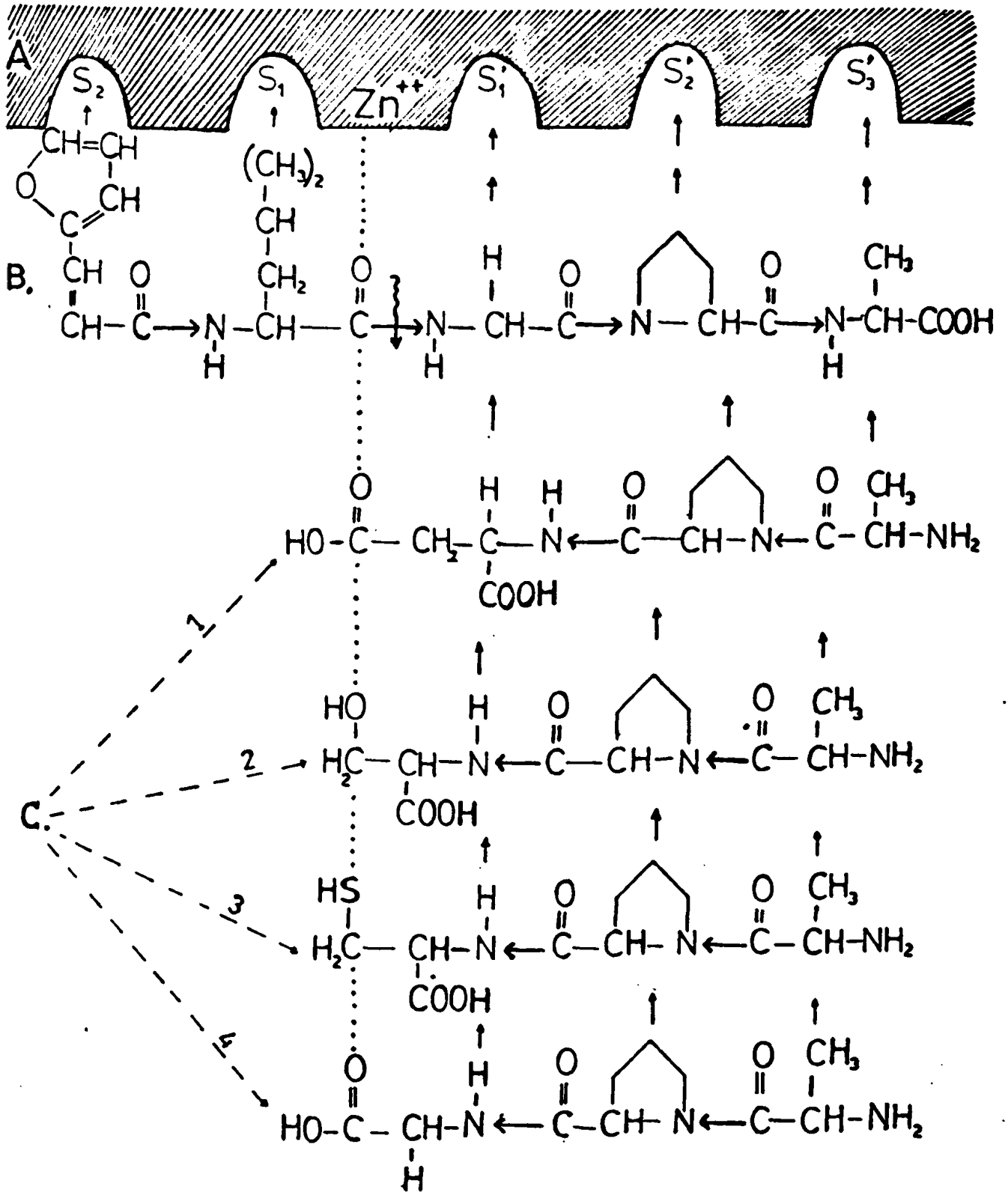
### 1.5. Σκοπός αυτής της εργασίας

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία συμβολή στη μελέτη των κολλαγενασών οι οποίες είναι μικρά σύνολα πρωτεασών (ενδοπεπτιδασών), που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του συνδετικού ιστού και έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων παθήσεων, όπως π.χ. κολλαχόνωση ή ανωμαλίες στην ανάπτυξη των ιστών που μπορεί να συνοδεύονται από φλεγμονώδεις καταστάσεις<sup>3</sup>. Μια λεπτομερέστερη ανασκόπηση των μέχρι σήμερα μελετών επί των κολλαγενασών δίνεται παρακάτω στο κεφάλαιο VII.

Με σκοπό την ανεύρεση αποτελεσματικών αναστολέων των κολλαγενασών που προέρχονται από το βακτήριο *Clostridium histolyticum*, ώστε να καταστεί δυνατή η εξειδικευμένη διαφοροποίηση και κατά συνέπεια ο χρωματογράφικός καθαρισμός των ελαφρώς διαφορετικών ποικιλιών αυτών των κολλαγενασών (α, β, γ, δ, ε και ζ), σχεδιάσαμε και συνθέσαμε μια σειρά πεπτιδίων του γενικού τύπου D-Ala-D-Pro-X όπου X=Gly, L-Asp, L-Ser και L-Cys και του γενικού τύπου L-Ala-L-Pro-X όπου X=L-Asp και L-Cys, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα διπεπτίδια, δηλ. χωρίς την D- ή L-Ala. Απώτερος βέβαια σκοπός αυτών των μελετών είναι να συμβάλλουμε στην ανεύρεση κατάλληλων αναστολέων οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς.

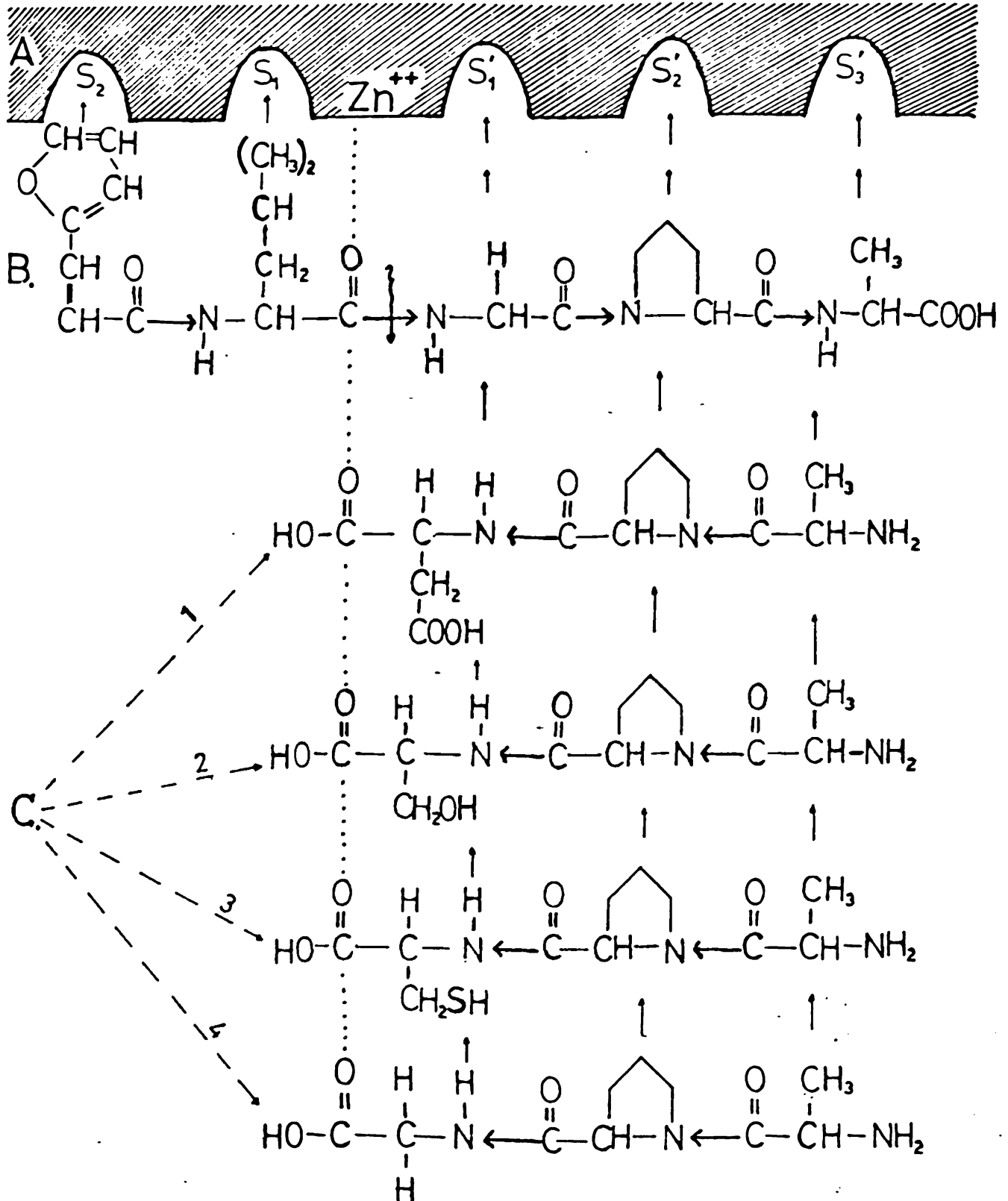
Όλα τα παραπάνω πεπτίδια που συνθέσαμε διαθέτουν κατάλληλες παράπλευρες ομάδες όπως υδρόξυλο-, καρβόξυλο- και σουλφυδρυλομάδα, οι οποίες θα μπορούσαν να συμπλακούν σε κάποιο βαθμό με τον  $Zn^{++}$  του ενεργού κέντρου της κολλαγενάσης, ώστε να επιτευχθεί η παρεμπόδιση της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Είναι όμως πιθανόν οι παραπάνω ανστολεις να συμπλακούν με τον  $Zn^{++}$  του ενεργού κέντρου του ενζύμου επίσης μέσω της α-COOH-ομάδας του P<sub>1</sub>' αμινοξέος (σχήμα 2). Στα σχήματα 1 και 2 παριστάνεται ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της κολλαγενάσης (A), το συνθετικό υπόστρωμα (B) με τον υπό υδρόλυση πεπτιδικό δεσμό και οι αναστολεις (C<sub>1,2,3,4</sub>) που μελετώνται, με την πιθανή θέση των παράπλευρων ομάδων τους σε σχέση με τις υποπεριοχές του ενζύμου, ανάλογα





**Σχήμα 1.** Ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της κολλαγενάσης (A), το συνθετικό υπόστρωμα (B), και οι αναστολείς ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) που μελετώνται με την πιθανή θέση των παράπλευρων ομάδων τους. Η σύμπλεξη του ενεργού κέντρου του ενζύμου και του αναστολέα πραγματοποιείται μέσω της παράπλευρης αλυσίδας του  $P_2'$  αμινοξέος του αναστολέα.





**Σχήμα 2.** Ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της κολλαγενάσης (A), το συνθετικό υπόστρωμα (B), και οι αναστολείς (C<sub>1,2,3,4</sub>) που μελετώνται με την πιθανή θέση των παράπλευρων ομάδων τους. Η σύμπλεξη του ενεργού κέντρου του ενζύμου και του αναστολέα πραγματοποιείται μέσω της α-COOH-ομάδας του P<sub>1</sub>' αμινοξέος του αναστολέα.



με το αν η σύμπλεξη επιτυγχάνεται μέσω της παράπλευρης αλυσίδας του  $R_1$  αμινοξέος (σχήμα 1) ή μέσω της  $\alpha$ -COOH-ομάδας του ίδιου αμινοξέος (σχήμα 2). Απο τα δύο αυτά σχήματα γίνεται φανερό ότι και στις δύο περιπτώσεις, ανεξάρτητα από το αν η σύμπλεξη επιτυγχάνεται μέσω της  $\alpha$ -COOH-ομάδας ή μέσω της παράπλευρης αλυσίδας, για την ικανοποίηση των υποπεριοχών  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  του ενζύμου απαιτείται αναστροφή των πεπτιδικών δεσμών των αναστολέων σε σχέση με τους πεπτιδικούς δεσμούς του υποστρώματος και του ενζύμου. Συμβαίνει έτσι μία τύπου RETRO-INVERSO σύμπλεξη αναστολέα-ενζύμου, κατά την οποία απαιτείται η επιλογή αμινοξέων D-στεreoχημικής διάταξης γι'αυτούς τους αναστολείς, ώστε να διατηρηθεί η κατάλληλη χωροδιάταξη των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων των αναστολέων, για την ικανοποίηση των απαιτήσεων των υποπεριοχών  $S_2$  και  $S_3$  του ενζύμου.

Η εισαγωγή εξάλλου D-αμινοξέων σε πεπτιδικούς αναστολείς είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ακόμη περισσότερο ισχυρούς αναστολείς, λόγω αυξημένης αντίστασης αυτών των αναστολέων σε οποιαδήποτε ενζυμική διάσπαση.

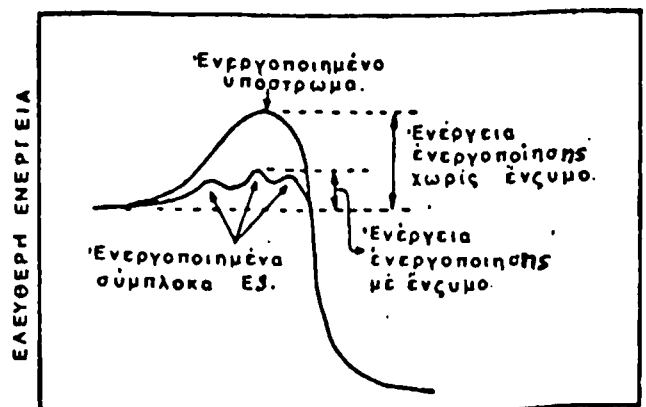


## II. Θερμοδυναμική θεώρηση των ενζύμων

Η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των ενζύμων απαιτεί μια προσεκτική διερεύνηση της επίδρασης τους πάνω στις χημικές αντιδράσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις κάποιο ένζυμο είναι υπεύθυνο για μια χημική αντίδραση η οποία διαφορετικά δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Ένα ένζυμο μπορεί να επιδράσει με δύο κυρίως τρόπους πάνω στην πορεία μιας χημικής αντίδρασης: α) Να επιταχύνει μια πολύ βραδέα αντίδραση της οποίας η ταχύτητα είναι δύσκολο να προσδιορισθεί παρ'όλο που θεωρητικά είναι δυνατή, β) Να πραγματοποιήσει μια χημική αντίδραση, η οποία απουσία ενζύμου είναι αδύνατη.

### II.1. Επιτάχυνση μιας αντίδρασης

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G$ , συνδέεται με την ενθαλπία  $\Delta H$  και την εντροπία  $\Delta S$  με τη σχέση:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  όπου  $T$ =απόλυτη θερμοκρασία. Μια αντίδραση είναι αυθόρμητη όταν συνοδεύεται από έκλυση ελεύθερης ενέργειας, δηλαδή όταν  $\Delta G < 0$ . Παρ'όλα αυτά πολλές αντιδράσεις δεν πραγματοποιούνται πρακτικά από μόνες τους σε θερμοκρασία δωματίου, αν και εμφανίζουν  $\Delta G < 0$ . Αυτή η συμπεριφορά ερμηνεύεται με τη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης, κατά την οποία ένα μόριο αντιδρώντος ή υποστρώματος για να μετατραπεί σε προϊόν πρέπει να υπερπηδήσει ένα "φράγμα ενέργειας" που ισούται με τη διαφορά της ενέργειάς του στην "κανονική κατάσταση" και της ενέργειας στην "κατάσταση μετάπτωσης". Το ποσό της ενέργειας που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση λέγεται ενέργεια ενεργοποίησης. Η ταχύτητα της



αντιδρασης  $S \rightarrow P$  όπου  $S$ =αντιδρόν ή υποστρώμα και  $P$ =προϊόντα, εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων του  $S$  που φθάνουν στη μεταβατική κατάσταση στη μονάδα του χρόνου. Αύξηση της ταχύτητας της αντιδρασης μπορεί να επιτευχθεί με ένα από τους παρακάτω τρόπους: α) να δοθεί ενέργεια στο σύστημα υπό μορφή θερμότητας, β) να ελαττωθούν οι απαιτήσεις του συστήματος σε ενέργεια ενεργοποίησης, γ) να συνδυασθεί η ελάττωση των απαιτήσεων σε ενέργεια με τον κατάλληλο προσανατολισμό των μορίων.

Στις ενζυμικές αντιδράσεις τα προϊόντα δημιουργούνται μετά από ένα αριθμό αντιδράσεων οι οποίες έχουν μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτό γίνεται λόγω της δημιουργίας των ενδιάμεσων συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος τα οποία μπορεί να είναι όχι μόνο ένα όπως στις απλούστερες περιπτώσεις, αλλά και περισσότερα. Η δεύτερη συμβολή των ενζύμων στην επιτάχυνση των αντιδράσεων είναι ο σωστός προσανατολισμός του υποστρώματος σε σχέση με το ενεργό κέντρο. Με τον τρόπο αυτό αυξάνονται σημαντικά οι πιθανότητες αποδοτικών συγκρούσεων μεταξύ υποστρωμάτων, προκειμένου να δημιουργηθούν τα ενεργοποιημένα μεταβατικά σύμπλοκα. Αποτέλεσμα του προσανατολισμού αυτού, μεγάλης σημασίας είναι η απόλυτη εξειδίκευση των ενζύμων στο να καταλύουν:

- 1ον) ένα μόνο είδος αντιδράσεων (εξειδίκευση δεσμού)
- 2ον) μία αντιδραση με συγκεκριμένα μόρια, (εξειδίκευση υποστρώματος)
- 3ον) δύο ή περισσότερες όμοιες χαρακτηριστικές ομάδες του υποστρώματος (εξειδίκευση ομάδας) ή και
- 4ον) ένα μόνο από τα δύο οπτικά ισομερή του υποστρώματος (οπτική εξειδίκευση).

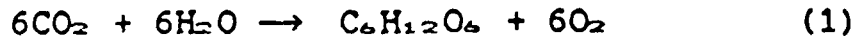
## II.2. Πραγματοποίηση μιας μη θερμοδυναμικά ευνοϊκής αντιδρασης

Ένα ένζυμο μπορεί να συμβάλλει στην πραγματοποίηση μιας αντιδρασης η οποία είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί απουσία



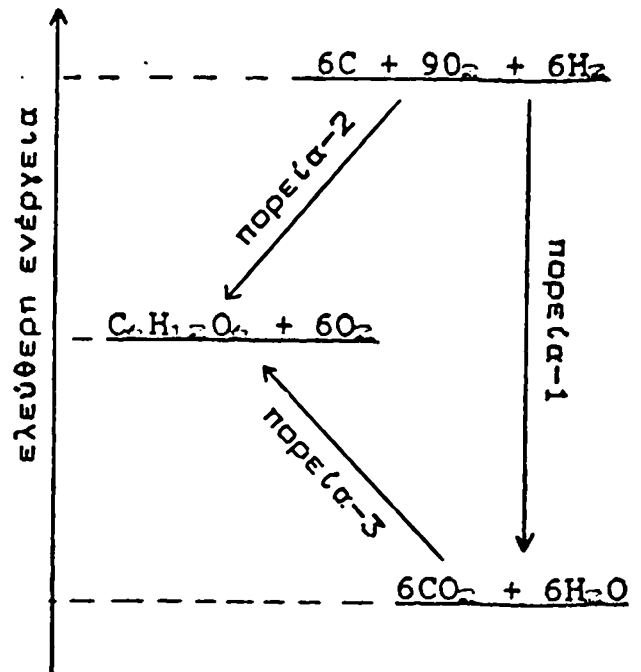
αυτού, εφ' όσον αυτό δεν αντιβαίνει τους βασικούς νόμους της Χημείας όπως π.χ. το νόμο διατήρησης της μάζας.

Ένα τυπικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι η μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα και νερού σε γλυκόζη και οξυγόνο:



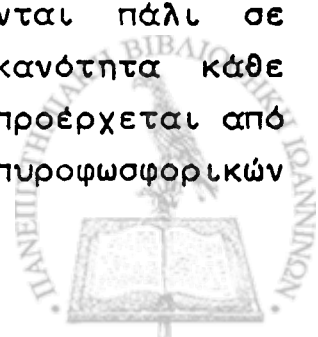
Σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση 1 Atm η αντίδραση δεν προχωρεί. Επειδή οι αυθόρμητες αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από αρνητική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G < 0$ ), οι πορεία 2 και 1 προχωρούν αυθόρμητα. Η πορεία 3 όμως δεν είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή και για να προχωρήσει πρέπει να της δοθεί εξωτερικά ένα ποσό ενέργειας.

Τέτοιες ενδεργονικές αντιδράσεις στο κύτταρο επιτελούνται χάρη στην ενζυμική τους σύζευξη με



τις αυθόρμητες αντιδράσεις υδρόλυσης των ενώσεων "υψηλής ενέργειας" οι οποίες προχωρούν με μεγάλη αρνητική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας. Οι ενώσεις υψηλής ενέργειας πετυχαίνουν τη διατήρηση της ελεύθερης ενέργειας στη μορφή της χημικής ενέργειας, την οποία κατόπιν προσφέρουν σε μία αντίδραση που δεν είναι αυθόρμητη και δεν μπορεί να προχωρήσει από μόνη της.

Η αντίδραση (1) προφανώς γίνεται μέσα στο κύτταρο εξ' αιτίας του μηχανισμού της ενζυμικής σύζευξης, είναι δε αποτέλεσμα πολλών ενζυμικών αντιδράσεων όπου αντιδρώντα εκτός του  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$  είναι και οι ενώσεις υψηλής ενέργειας ATP και NADPH. Προϊόντα της αντίδρασης (1) εκτός της γλυκόζης είναι τα NADP και ADP, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται πάλι σε NADPH και ATP με ταυτόχρονη έκλυση οξυγόνου. Η ικανότητα κάθε ζωντανού οργανισμού να αποθηκεύει ενέργεια, που προέρχεται από την καύση των θρεπτικών υλών, με τη μορφή των πυροφωσφορικών





δεσμών του ATP και να την αποδίδει όποτε απαιτείται, οφείλεται αποκλειστικά στην ύπαρξη κατάλληλων ενζύμων που καταλύουν τέτοιες αλληλομετατροπές. Οι τελευταίες αποτελούν τη βάση της ενεργειακής συζευξης αναβολισμού και καταβολισμού που είναι βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία του μεταβολισμού.

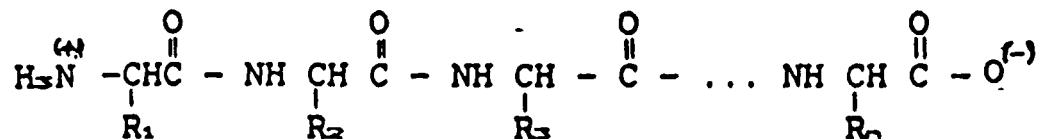
Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι το φαινόμενο της ζωής αποτελεί τη συνισταμένη ενός μεγάλου αριθμού χημικών μεταβολών, που επαναλαμβάνονται συνεχώς μέσα στο πρωτόπλασμα με τη βοήθεια των ενζύμων και συνενζύμων και που καθορίζουν την ενεργειακή κατάσταση και γενικότερα τη δραστηριότητα του κυττάρου.



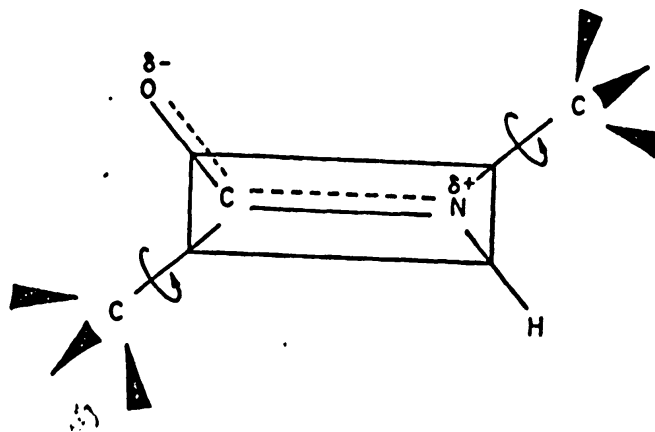
III. Τα ένζυμα ως πρωτεϊνικά μόρια. Δευτεροταχής -Τριτοταχής- Τεταρτοταχής και Πενμπτοταχής Δομή.

Η λεπτομερής εξέταση κάθε ενζύμου πραγματοποιείται μόνο εφ' όσον έχει απομονωθεί σε καθαρή ή σχετικά καθαρή κατάσταση. Το γεγονός ότι τα ένζυμα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH, καθιστά τη μελέτη τους εξαιρετικά δύσκολη. Από το 1926 που ο Sumner κρυστάλλωσε το πρώτο ένζυμο την ουρεάση μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί σε καθαρή κατάσταση εκατοντάδες ένζυμα και έχει αποδειχθεί ότι όλα είναι πρωτεϊνικής φύσης.

Όπως όλες οι πρωτεΐνες, έτσι και τα ένζυμα αποτελούνται από αλυσίδες αμινοξέων που συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του γειτονικού αμινοξέος.



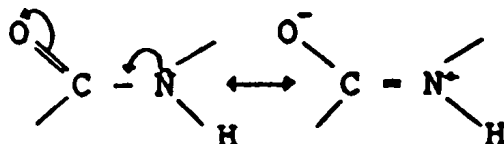
Ο αμιδικός δεσμός που ονομάζεται και πεπτιδικός είναι επίπεδος<sup>α</sup> και σε trans διάταξη όπως φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. Η επίπεδη και άκαμπτη διάταξη των πεπτιδικών δεσμών δεν επιτρέπει παρά μόνο τις περιστροφές γύρω από τους δεσμούς N-C<sup>α</sup> και C<sup>α</sup>-C.



Η επίπεδη διάταξη του πεπτιδικού δεσμού οφείλεται στη σημαντική μετατόπιση του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου προς το καρβονυλικό οξυγόνο, με αποτέλεσμα να μικραίνει ο δεσμός C-N και να έχει εν μέρει (κατά 40% περίπου) τις ιδιότητες διπλού δεσμού, ενώ ο δεσμός C=O να έχει στον ίδιο περίπου βαθμό ιδιότητες απλού δεσμού.



Η τελική διαμόρφωση ενός ενζύμου μπορεί να εξεταστεί σε διάφορα επίπεδα, αρχίζοντας από το απλούστερο της πρωτοταχούς δομής και συνεχίζοντας στα πιο σύνθετα της δευτεροταχούς, τριτοταχούς, τεταρτοταχούς και πεμπτοταχούς δομής<sup>3,4</sup>.

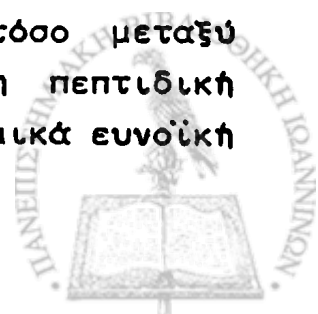
Η αλληλουχία των αμινοξέων μέσα στην πεπτιδική αλυσίδα καθορίζει την πρωτοταγή σύνταξη.

Η πεπτιδική αλυσίδα σπάνια παρουσιάζει μέσα στο χώρο ευθύγραμμη διαμόρφωση, ενώ τις περισσότερες φορές εμφανίζει μία πλέον συμπαγή μορφή λόγω του ιδιαίτερου προσανατολισμού του κάθε αμινοξέος μέσα στο χώρο, που καθορίζεται από τη δευτεροταγή σύνταξη.

Η τριτοταγής σύνταξη ενός πεπτιδίου καθορίζεται από μια εκ νέου διεύθυνση στο χώρο, ώστε η ήδη υπάρχουσα α-έλικα ή β-διάταξη ενός μορίου να σχηματίζει μια καινούργια α-έλικα ή β-διάταξη.

Σύνδυασμός πολυπεπτιδικών αλυσίδων με παρόμοιας φύσης δυνάμεις, ώστε να σχηματίζονται σταθερές μονάδες στο χώρο καθορίζει την τεταρτοταγή δομή.

Μολονότι ο πεπτιδικός δεσμός είναι αστηρά επίπεδος, η σπονδυλική στήλη των επαναλαμβανόμενων (-HN-CH-CO-) μονάδων  
 $\text{R}$   
επιτρέπει σημαντική ευκαμψία στη τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης. Οι πλευρικές αλυσίδες R αλληλεπιδρούν, τόσο μεταξύ τους όσο και με τα μόρια του διαλύτη, ώστε τελικά η πεπτιδική αλυσίδα να κατέχει την πιο σταθερή και θερμοδυναμικά ευνοϊκή



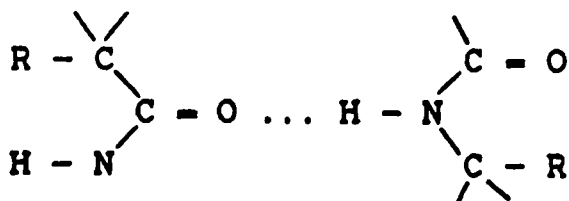
δομή. Μικρές αλλαγές στο περιβάλλον των ενζύμων (π.χ. θερμοκρασία, pH ή ιοντική ισχύς) μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στη δομή τους, οι οποίες μερικές φορές μπορούν να καταστρέψουν και την καταλυτική τους δράση. Οι επιπτώσεις αυτές τόσο στις φυσικοχημικές όσο και στις βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών αποτελούν τη λεγόμενη μετουσίωση αυτών.

### III. 1. Δεσμοί Υδρογόνου - Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

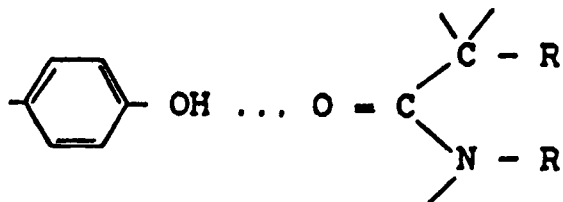
Οι κυριώτεροι τύποι δυνάμεων που υπεισέρχονται στη διατήρηση της διαμόρφωσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ σε μικρότερο βαθμό συνεισφέρουν οι ιοντικοί δεσμοί και οι δυνάμεις Van der Waals.

Η δευτεροταχής σύνταξη μιας πρωτεΐνης σταθεροποιείται κύρια με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται:

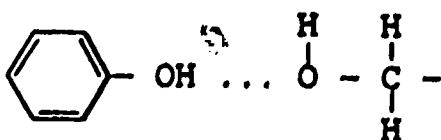
- α) μεταξύ ατόμων του πεπτιδικού σκελετού
- β) μεταξύ παράπλευρης αλυσίδας και πεπτιδικού σκελετού
- γ) μεταξύ παράπλευρων αλυσίδων



Δεσμός υδρογόνου μεταξύ ατόμων του πεπτιδικού σκελετού.



Δεσμός υδρογόνου μεταξύ παράπλευρης αλυσίδας και πεπτιδικού σκελετού.



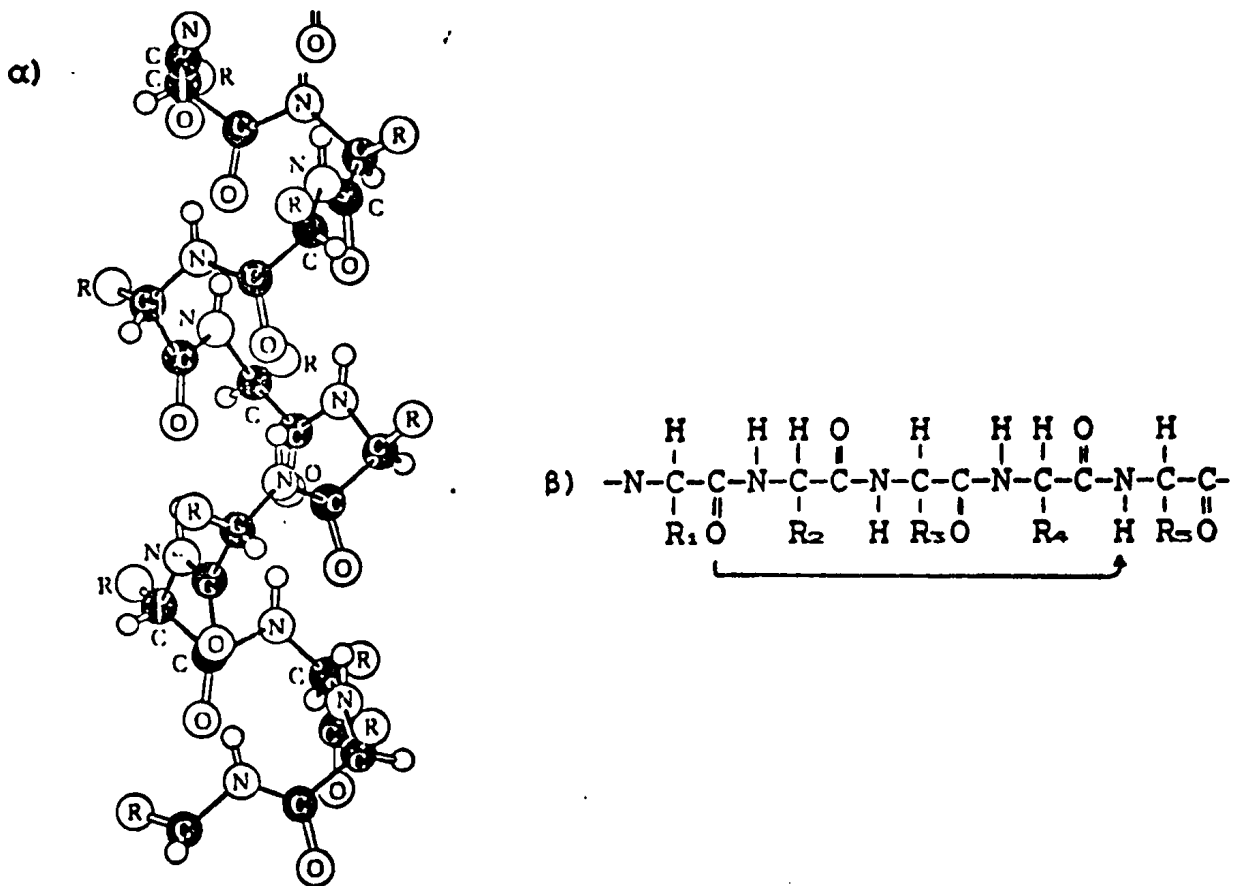
Δεσμός υδρογόνου μεταξύ παράπλευρων αλυσίδων (πχ τυροσίνης και σερίνης).



Οι δύο βασικές δευτεροταγείς δομές στις πρωτεΐνες είναι:  
α) η α-έλικα και β) η β-διάταξη πτυχωτού φύλλου.

α) Σύνταξη α-έλικας: Οι Pauling και Corey<sup>7</sup> κατασκεύασαν από ατομικά πρότυπα πολυπεπτιδικές αλυσίδες και βρήκαν πως η απλούστερη και σταθερότερη διάταξη είναι αυτή της α-έλικας (σχήμα 4).

Στη διάταξη αυτή συναντάμε 3,6 πεπτιδικές μονάδες σε μια πλήρη σπείρα της έλικας. Η σταθερότητα της α-έλικας οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του CO κάθε πεπτιδικού δεσμού και της NH-ομάδας του τέταρτου κατά σειρά πεπτιδικού δεσμού προς την κατεύθυνση της ακραίας καρβοξυλομάδας. Τυπικά



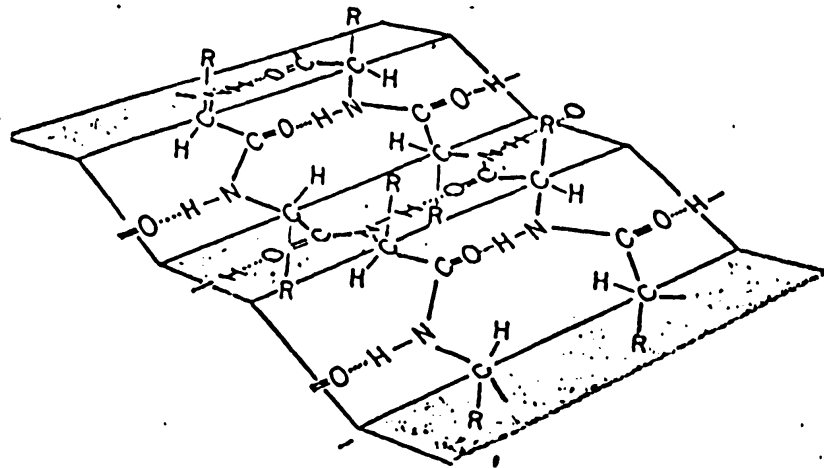
Σχήμα 4. α) Αναπαράσταση α-έλικας με τους χαρακτηριστικούς δεσμούς υδρογόνου, β) Η σταθερότητα της α-έλικας οφείλεται στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του CO ενός πεπτιδικού δεσμού και της NH-ομάδας του τέταρτου κατά σειρά πεπτιδικού δεσμού.



παραδείγματα πρωτεϊνών που η δομή τους έχει ως βάση την α-έλικα είναι η α-κερατίνη, η μυοσίνη και η επιδερμίνη.

β) β-διάταξη πτυχωτού φύλλου: Από τους Pauling και Corey<sup>2</sup> προτάθηκε άλλο ένα μοντέλο δομής που ονομάζεται διάταξη β-πτυχωτού φύλλου και σύμφωνα με το οποίο έχουμε μία πριονοειδή διάταξη της πεπτιδικής αλυσίδας. Με τον τρόπο αυτό παρακείμενες πεπτιδικές αλυσίδες σταθεροποιούνται με αποκατάσταση δεσμών υδρογόνου κάθετων προς τον άξονα τους, στους οποίους συμμετέχουν όλες οι ομάδες CO και NH και προκύπτει η δομή β-πτυχωτού φύλλου στην οποία οι πεπτιδικές αλυσίδες μπορούν να είναι είτε παράλληλες είτε αντιπαράλληλες. Στη διάταξη β-πτυχωτού φύλλου οι πλευρικές ομάδες R προεξέχουν από την επιφάνεια του πτυχωτού φύλλου προς τα πάνω και προς τα κάτω.

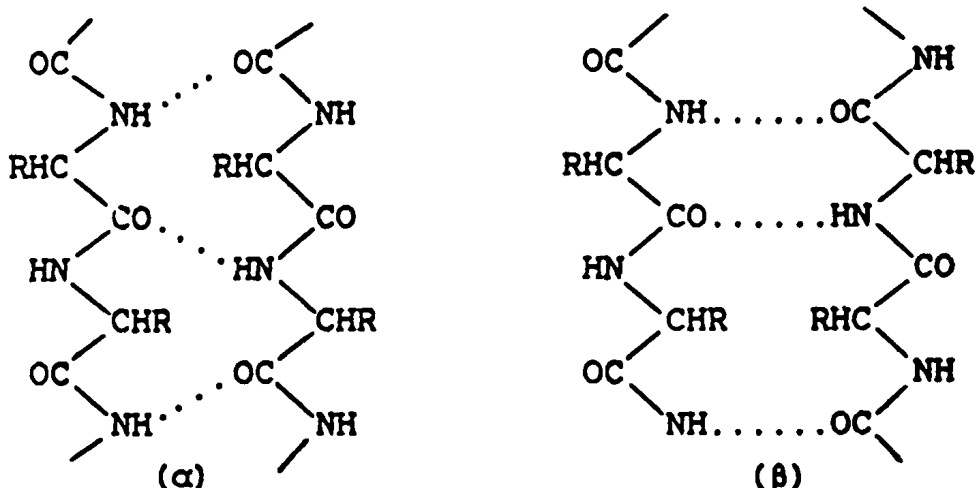
Αντιπροσωπευτικός εκπρόσωπος δομής β-πτυχωτού φύλλου με παράλληλη διάταξη είναι η β-κερατίνη<sup>3</sup> ενώ με αντιπαράλληλη διάταξη η φιβροΐνη της μετάξης.



Σχήμα 5. Σύνταξη β'-πτυχωτού φύλλου με αντιπαράλληλες πεπτιδικές αλυσίδες.

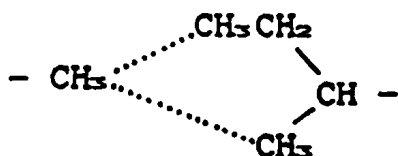
Εκτός από τους δεσμούς υδρογόνου σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δευτεροταχούς σύνταξης μιας πρωτεΐνης παίζουν και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο Kauzmann<sup>10</sup> ήταν ο πρώτος που καθιέρωσε τον όρο "υδρόφοβος δεσμός" για να ορίσει την αλληλεπίδραση μη πολικών πλευρικών αλυσίδων. Αναλυτικά οι



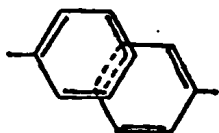


**Σχήμα 6.** Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ δύο παράλληλων (α), και δύο αντιπαράλληλων (β), πεπτιδικών αλυσίδων.

υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οφείλονται στην τάση των παράπλευρων αλυσίδων R που δεν είναι υδατοδιαλυτές να απομακρύνονται από το υδατικό μέσο που περιβάλλει την πρωτεΐνη και να προσανατο-



Αλληλεπίδραση υδρόφοβων παράπλευρων αλυσίδων (π.χ. αλανίνης και ισολευκίνης).



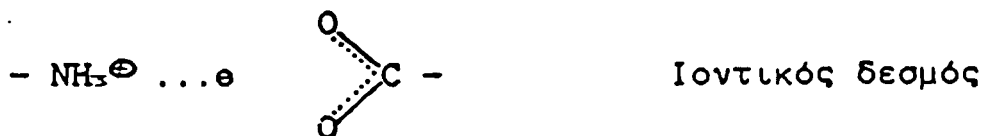
Αλληλεπίδραση αρωματικών δακτυλίων.

λίζονται στο εσωτερικό του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες να εξαναγκάζονται να πλησιάσουν η μία την άλλη όχι λόγω έλξης, αλλά προς αποφυγή του νερού. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι αυξανόμενης της θερμοκρασίας μέχρι το όριο των 60°C, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις γίνονται ισχυρότερες και αυξάνονται αυξανόμενης της πολικότητας του διαλύτη ή παρουσία ιόντων<sup>21</sup>.



### III. 2. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Δυνάμεις Van der Waals

Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δημιουργούνται μεταξύ μιας θετικά φορτισμένης αμινομάδας που ανήκει, είτε στο αμινοτελικό αμινοξύ, είτε στην πλευρική αλυσίδα της λυσίνης ή της γουανιδομάδας της αργινίνης ή ιστιδίνης και μιας αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού ή γλουταμινικού αμινοξέως ή του καρβοξυτελικού αμινοξέος.



Αύξηση της θερμοκρασίας σταθεροποιεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ αντίθετα αύξηση της συγκέντρωσης άλατος τις αποσταθεροποιεί.

Οι δυνάμεις Van der Waals ενεργούν σε μικρή σχετικά απόσταση, η ισχύς τους είναι της τάξεως περίπου του δεσμού υδρογόνου και μεταβάλλονται ανάλογα προς το  $r^{-6}$  όπου  $r$  η απόσταση μεταξύ των μορίων. Οι δυνάμεις αυτές διακρίνονται στις επιδράσεις διπόλου-διπόλου, διπόλου-επαχόμενου διπόλου και στις δυνάμεις διασποράς ή London<sup>12</sup>. Οι τελευταίες είναι οι πλέον ισχυρές δυνάμεις Van der Waals, αναπτύσσονται μεταξύ μη πολικών μορίων σε μη πολικό μέσο και εξηγούνται με την παραδοχή ότι το ηλεκτρονιακό νέφος και ο πυρήνας βρίσκονται σε κατάσταση δόνησης, με συνέπεια να σχηματίζονται στιγμιαία δίπολα τα οποία έλκονται μεταξύ τους.

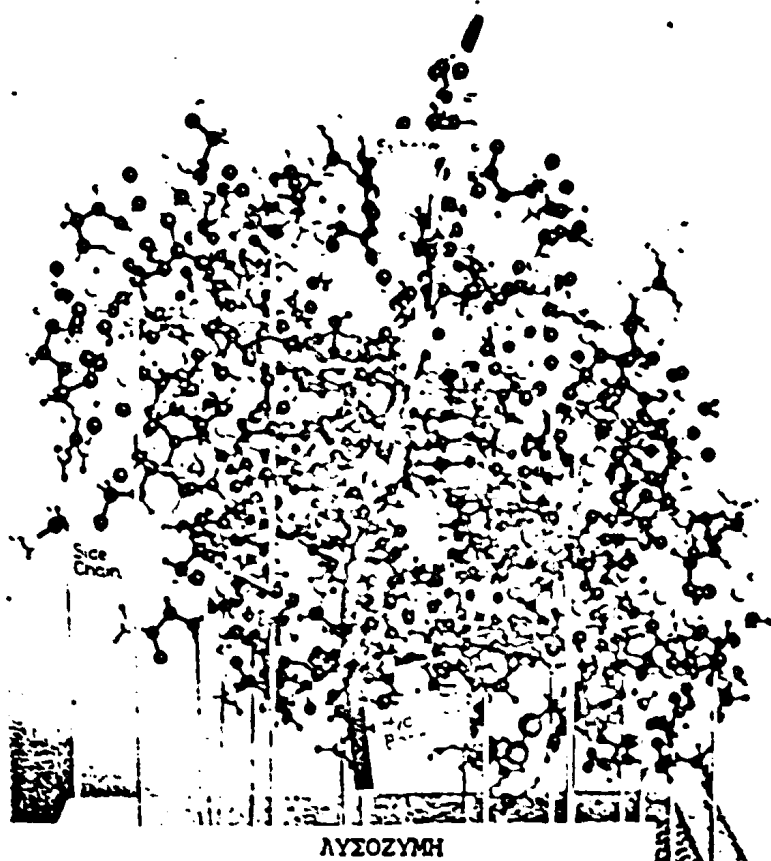
Από τη μέχρι σήμερα κρυσταλλογραφική μελέτη των ενζύμων έχει διαπιστωθεί ότι πολλά ένζυμα είναι μονομερείς πρωτεΐνες, δηλαδή το μόριο τους αποτελείται από μία απλή αλυσίδα η οποία αναδιπλώνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει τη μέγιστη υδροφοβική αλληλεπίδραση, η οποία θα είναι σύμφωνη με το βέλτιστο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ποικίλων πλευ-





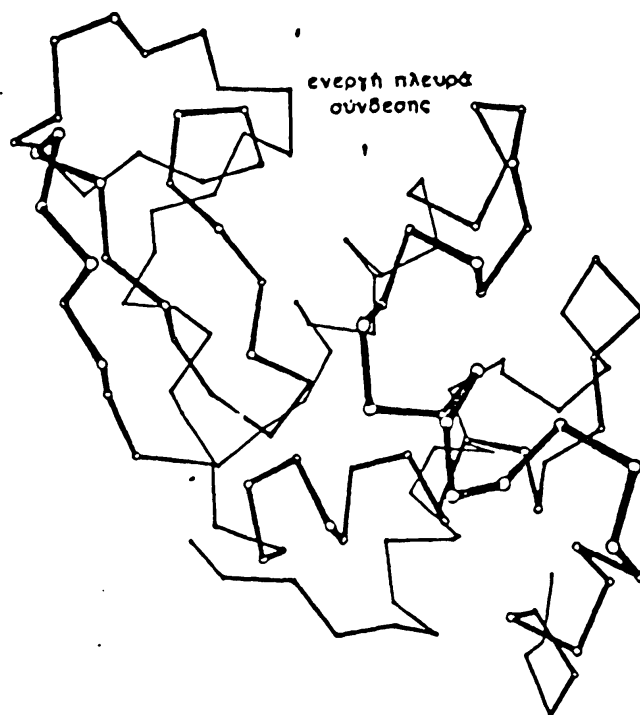
ρικών αλυσίδων και του πεπτιδικού σκελετού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου ενζύμου είναι η λυσοζύμη<sup>13, 14</sup>.

Το μόριο της λυσοζύμης (σχ.7,8) αποτελείται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα με 129 αμινοξέα, της οποίας η διαμόρφωση είναι α-έλικα και μια μόνο περιοχή β-πτυχωτού φύλλου.



Σχήμα 7. Ένα μοριακό μοντέλο της λυσοζύμης στο οποίο σημειώνεται η δέσμευση του υποστρώματος σε μία ρωγή στην επιφάνεια του ενζύμου.





Σχήμα Β. Διαγραμματική αναπαράσταση της αλυσίδας της λυσοζύμης.

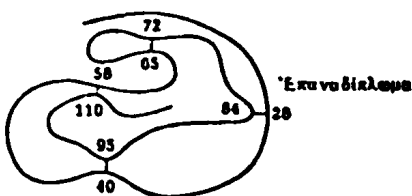
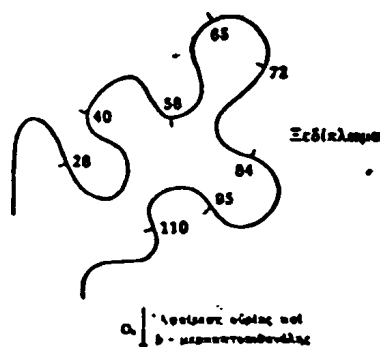
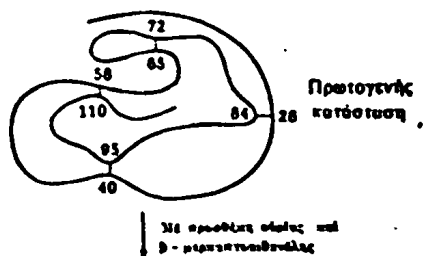
### III. 3. Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας

Το "κεντρικό δόγμα" της Μοριακής Βιολογίας δέχεται ότι η διαμόρφωση που υιοθετείται από μία πρωτεΐνη στη μητρική της ή πρωτογενή κατάσταση είναι αυτή της χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας δηλαδή η περισσότερο σταθερή θερμοδυναμικά στο φυσικό περιβάλλον. Αυτή η γενική αρχή ισχύει σε συστήματα που βρίσκονται σε ισορροπία, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει στους ζωντανούς οργανισμούς και επομένως δεν είναι πάντα εφικτό στην πολυπεπτιδική αλυσίδα να αναζητά την πλέον σταθερή στερεοχημική διάταξη. Η παραπάνω παραδοχή του "κεντρικού δόγματος" της Μοριακής βιολογίας αν και ισχύει σε αρκετά πρωτεϊνικά μόρια όπως η ριβονουκλεάση-Α, λυσοζύμη, τρυψίνη, κ.α. θα παραμείνει ωστόσο υπόθεση μέχρι να μελετηθούν πολύ περισσότερα ένζυμα.

Έχουν περιγραφεί πειράματα στα οποία η πρωτογενής διαμόρφωση ανασχηματίζεται αυθόρμητα ύστερα από μεταβολή της. Έτσι



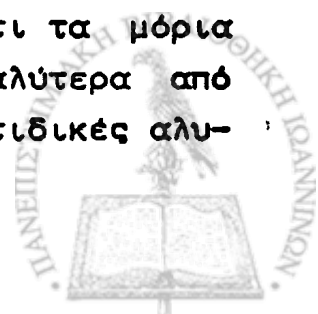
αναγωγή των τεσσάρων δισουλφιδικών δεσμών της ριβονουκλεάσης με μερκαπτοαιθανόλη σε διάλυμα ΒΜ ουρίας, προκαλεί ξεδίπλωμα του μορίου που συνοδεύεται από μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και απώλεια της ενζυμικής δράσης. Κατάλληλες συνθήκες οδηγούν στην αυθόρμητη ανάκτηση της πρωτογενούς διαμόρφωσης που συνοδεύεται με επάνοδο της ενζυμικής δραστηριότητας και των χαρακτηριστικών φυσικοχημικών παραμέτρων της ριβονουκλεάσης<sup>15</sup>. Η ανάκτηση της πρωτογενούς διαμόρφωσης προϋποθέτει σωστό ανασχηματισμό των τεσσάρων δεσμών -S-S-. Μια ικανοποιητική εξήγηση της δημιουργίας των τεσσάρων ίδιων δισουλφιδικών δεσμών είναι η εξής: Εφ'όσον ο πρώτος δισουλφικός δεσμός σχηματισθεί με οξειδωση δύο σουλφυδρυλομάδων που βρίσκονται κοντά, δισουλφιδική ανταλλαγή λαμβάνει χώρα<sup>16</sup>.



Έτσι επιτρέπεται στην επαναοξειδωμένη πρωτεΐνη να αναζητήσει μέσω όλων των δυνατών συνδιασμών τον πιο "σωστό", δηλαδή τον περισσότερο σταθερό και επομένως τον πιο πιθανό.

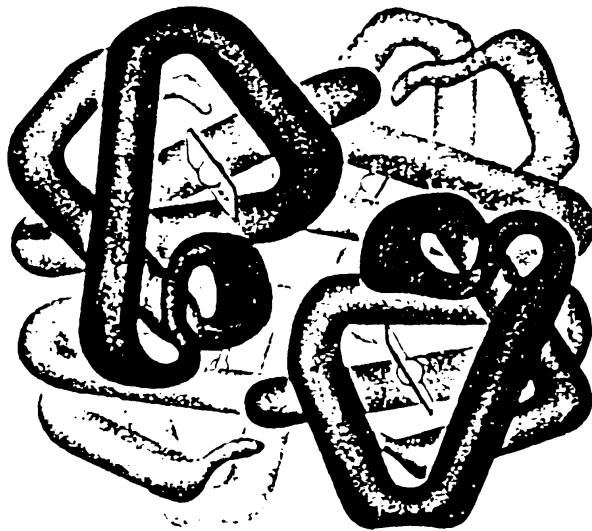
### III.4. Τεταρτοταχής και Πemptοταχής δομή των ενζύμων

Στην τελευταία δεκαετία εδραιώθηκε η άποψη ότι τα μόρια των περισσότερων πρωτεϊνών με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 50.000 αποτελούνται από περισσότερες της μιας πεπτιδικές αλυ-



σίδες. Η διάταξη αυτών των αλυσίδων και οι ανατομικές σχέσεις της μιας προς τις άλλες δεν είναι τυχαίες, αλλά σαφώς καθορισμένες και επαναλαμβάνονται πιστά από μόριο σε μόριο. Αυτές οι σχέσεις στο χώρο των διαφόρων πεπτιδικών αλυσίδων ενός πρωτεϊνικού μορίου αποτελούν την τεταρτοταγή διαμόρφωση της δομής του μορίου.

Πολλά πρωτεϊνικά μόρια όπως π.χ. της λυσοζύμης είναι μονομερείς πρωτεΐνες, δεν έχουν δηλαδή τεταρτοταγή δομή. Αντίθετα άλλα μόρια όπως της αιμοσφαιρίνης<sup>17, 18</sup> (σχ.9) και της φωσφορυλο-οξικής μούτάσης<sup>19</sup> παρουσιάζουν τεταρτοταγή δομή (σχ. 10).

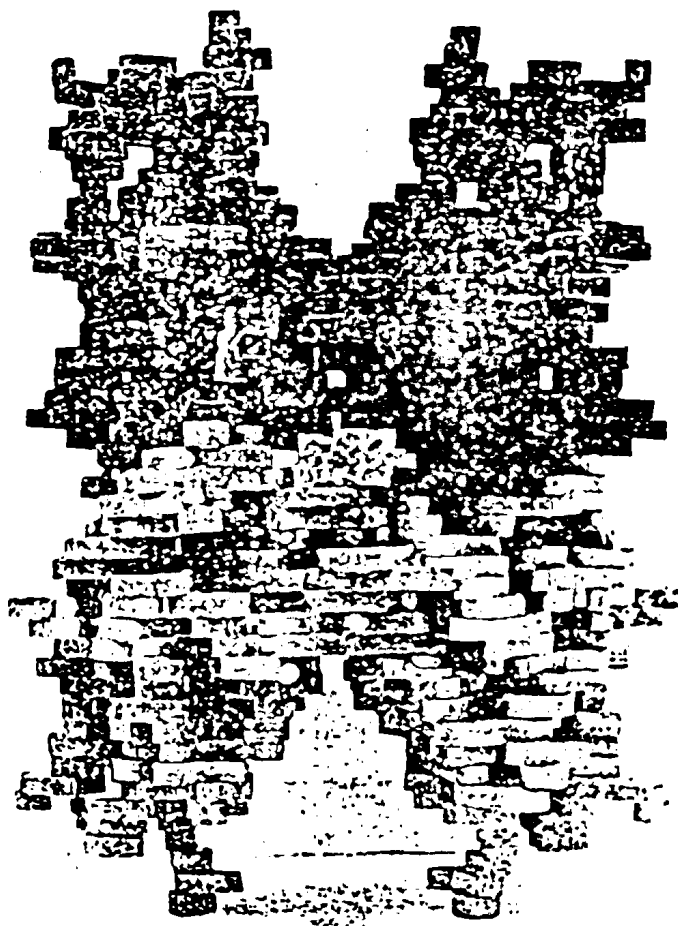


Σχήμα 9. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης.

Η συγκρότηση τέτοιων μορίων από τις αντίστοιχες πεπτιδικές αλυσίδες οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις ομάδων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια και συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη υδρόφοβων αμινοξέων στις πεπτιδικές αλυσίδες.

Μόρια που περιέχουν περισσότερο από 30% υδρόφοβα αμινοξέα, είναι αδύνατον να διπλώσουν κατά τέτοιο τρόπο ώστε όλες οι υδρόφοβες ομάδες να βρεθούν στον εσωτερικό χώρο που δημιουργείται από την αναδίπλωση κάθε απλής αλυσίδας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα πολλές υδρόφοβες ομάδες να είναι εκτεθειμένες στο υδατικό μέσο και να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

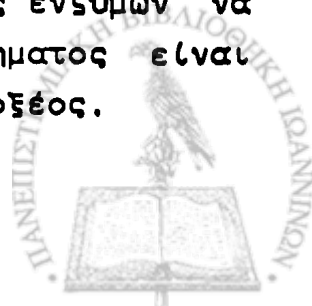




Σχήμα 10. Το μόριο της φωσφορυλο-οξεικής μούτάσης.

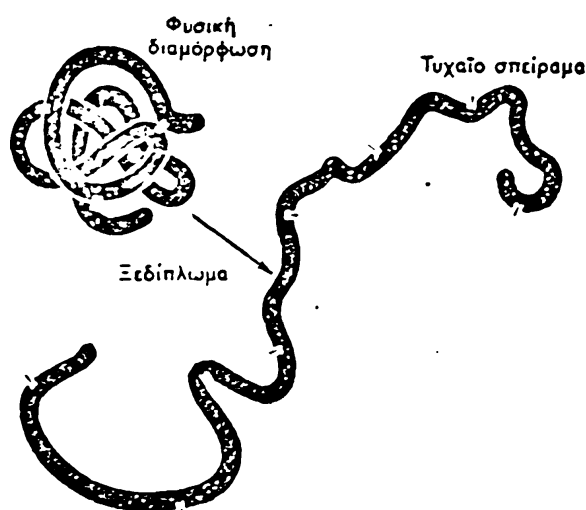
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η κατευθυντήρια δύναμη για την τεταρτοταγή δομή είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενώ οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι μικρότερης σημασίας. Όπως και στην περίπτωση της τριτοταγούς δομής, η φυσική τεταρτοταγής δομή είναι κάτω από τις κυτταρικές συνθήκες η πλέον σταθερή θερμοδυναμικά και επομένως η πλέον πιθανή.

Τέλος το ανώτερο επίπεδο οργάνωσης στη δομή των ενζύμων είναι η πεμπτοταγής διαμόρφωση. Αυτή αφορά τις σχέσεις στο χώρο που εμφανίζουν τα μεμονωμένα ένζυμα στα πολυενζυμικά συστήματα. Η δομή των μακρομοριακών αυτών συμπλόκων σταθεροποιείται από δευτερεύοντες δεσμούς όπως και στη τεταρτοταγή διαμόρφωση, έτσι ώστε η σχετική θέση των επιμέρους ενζύμων να παραμένει σταθερή. Παράδειγμα πολυενζυμικού συστήματος είναι το σύμπλοκο της δεϋδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος.



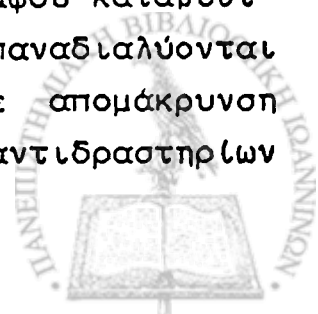
### III.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου.

Μεταβολές στη θερμοκρασία, στο pH, στην ιοντική ισχύς, ή στη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος μιας πρωτεΐνης, συνήθως έχουν επιπτώσεις στην τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Δηλαδή παρατηρούμε στην πρωτεΐνη σημαντική μεταβολή της πρωτογενούς δομής, πράγμα που ονομάζεται σύμφωνα με τον ορισμό του Tanford "μετουσίωση της πρωτεΐνης"<sup>20</sup>.



Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση του ξεδιπλώματος μιας πρωτεΐνης.

Υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας (6-8M) και αλάτων γουανιδίνης (4-8M) καθώς και ανιονικά και κατιονικά απορρυπαντικά προκαλούν ξεδίπλωμα της πεπτιδικής αλυσίδας πιθανόν μέσω παρεμβάσεων στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (σχ.11). Επίσης ορισμένα αντιδραστήρια προκαλούν καθίζηση των πρωτεϊνών και συγχρόνως οριστική ή μη οριστική απώλεια της ενζυμικής δράσης. Τυπικά παραδείγματα μη οριστικής απώλειας της ενζυμικής δράσης αποτελεί η χρήση των ιόντων υδραργύρου κατά την πορεία καθαρισμού των ενζύμων παπάινη και ενολάση. Τα ένζυμα αυτά αφού καταβυθιστούν και συγχρόνως μετατραπούν σε ανενεργά, επαναδιαλύονται και συγχρόνως επανακτούν την ενεργότητά τους, με απομάκρυνση των ιόντων υδραργύρου με τη βοήθεια χηλικών αντιδραστηρίων όπως το E.D.T.A.



Γενικά όταν η μετουσίωση προκαλεί μόνον το ξεδίπλωμα της πεπτιδικής αλυσίδας είναι πλήρως αντιστρεπτή, ενώ όταν προκαλεί μεταβολές στις πλάγιες αλυσίδες ή μεταβολή στη διάταξη των δισουλφιδικών δεσμών είναι μη αντιστρεπτή.



#### IV. Δομή Ενζύμων και λειτουργία

Τα ένζυμα κατατάσσονται στις λειτουργικές πρωτεΐνες, σ'εκείνες δηλαδή που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δεσμεύουν εκλεκτικά ορισμένες ουσίες που γενικά μεν καλούνται "ligands", ειδικά δε για τα ένζυμα υποστρώματα. Στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, μπορεί να υπάρχουν πολλά σημεία σύνδεσης, καθένα όμως απ'αυτά έχει την ικανότητα να δεσμεύει μόνο μιας ορισμένης κατηγορίας υποκαταστάτες. Αυτό αποτελεί την εξειδίκευση των ενζύμων η οποία εξαρτάται:

- α) από την ύπαρξη χαρακτηριστικών γεωμετρικών προϋποθέσεων για το σωστό προσανατολισμό του υποστρώματος στο σημείο σύνδεσης και β) από την παρουσία χαρακτηριστικών ομάδων στο ένζυμο και στο υπόστρωμα για την ανάπτυξη δυνάμεων σύνδεσης.

Το υπόστρωμα δεσμεύεται στην ενεργό περιοχή του ενζύμου, με τον ίδιο περίπου τρόπο που δεσμεύονται γενικά οι διάφοροι υποκαταστάτες στις πρωτεΐνες. Στα ένζυμα η σύνδεση αυτή ακολουθείται από μια χημική αντίδραση λόγω της ειδικής φύσης της ενεργού περιοχής.

#### IV. 1.1. Σημεία σύνδεσης του ενζύμου

Η γενική μορφή μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι:

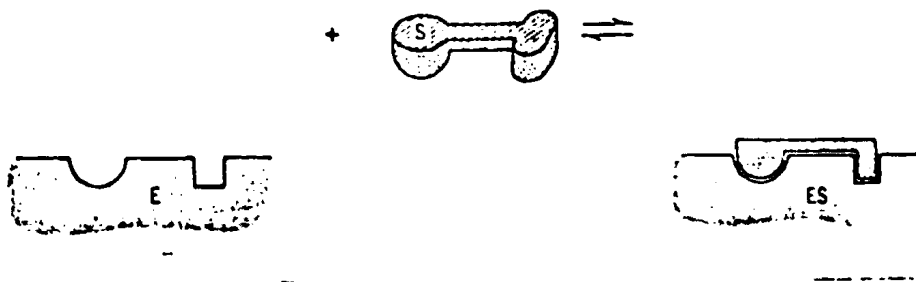


Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES) είναι συνέπεια των εξής:

- α) του υψηλού βαθμού εξειδίκευσης που παρουσιάζουν τα ένζυμα (Fischer 1894)<sup>21</sup>.
- β) της μορφής της καμπύλης της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Brown 1902<sup>22</sup>, Henri 1902<sup>23</sup> και
- γ) της προστασίας που παρέχουν τα υποστρώματα στην αδρανοποίηση των ενζύμων (O'Sullivan and Tompson 1890<sup>24</sup>).







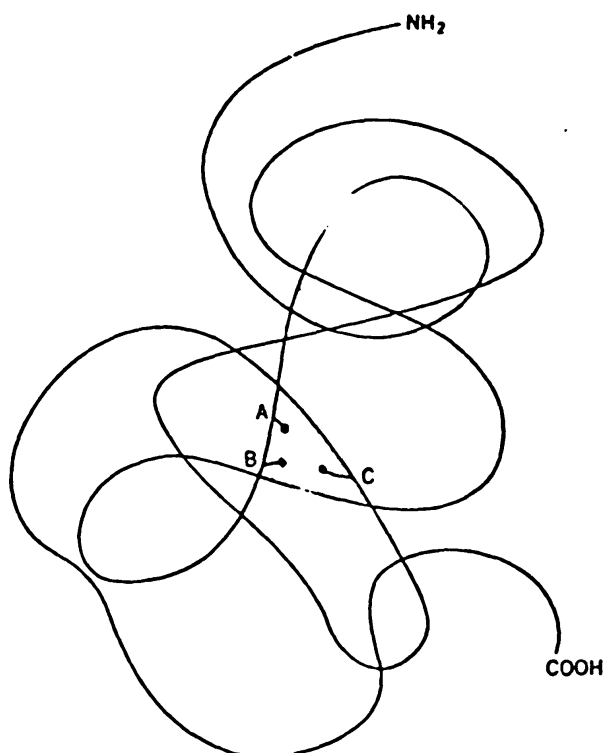
Σχήμα 12. Πρότυπο κλειδί-κλειδαριά.

Ο υψηλός βαθμός εξειδίκευσης των ενζύμων παρακίνησε τον Emil Fischer το 1894 να προτείνει ότι το υποστρώμα και το ένζυμο ταιριάζουν όπως το κλειδί στην κλειδαριά (lock-key hypothesis)<sup>21</sup> (σχ.12). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή ο Fischer θεώρησε ότι κάθε ένζυμο έχει μια περιοχή, που καλείται σημείο σύνδεσης του υποστρώματος ή ενεργός περιοχή και η οποία είναι συμπληρωματική ως προς το μέγεθος, σχήμα και τη χημική φύση του μορίου του υποστρώματος. Έτσι μόνο ένα είδος μορίου ή το πολύ ένας περιορισμένος αριθμός μορίων, μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο και να δράσουν ως υποστρώματα.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η ενεργός περιοχή δεν είναι μία άκαμπτη κοιλότητα, αλλά μάλλον μία ακριβής διευθέτηση στο χώρο των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με αντίστοιχες ομάδες του υποστρώματος. Επίσης μια σύγκριση των μοριακών βαρών των ενζύμων και των αντίστοιχων υποστρωμάτων τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σημείο σύνδεσης πρέπει να βρίσκεται σε ένα μικρό τμήμα του μορίου, που στα περισσότερα ένζυμα παίρνει τη μορφή μιας ρωγμής ή σχισμής στη δομή του ενζύμου. Τα άτομα των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που αποτελούν το σημείο σύνδεσης (A, B, C, σχ.13), έρχονται σε επαφή με τα άτομα του υποστρώματος, πλησιάζουν δηλ. σε ακτίνα Van der Waals.

Ηλεκτροστατικές έλξεις, δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όλες μαζί ή και κάθε μια χωριστά, εξασφαλίζουν την αντιστρεπτή σύνδεση του υποστρώματος στην ενεργό περιοχή του ενζύμου.





Σχήμα 13. Σχηματική παράσταση της ενεργούς περιοχής ενός ενζύμου με A, B, C τα σημεία σύνδεσης.

Εκτός των ομάδων αυτών που αντιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα, μπορεί να υπάρχουν και πλευρικές αλυσίδες οι οποίες, αν και βρίσκονται πολύ κοντά στο υπόστρωμα δεν αντιδρούν άμεσα με αυτό. Εάν οι ομάδες αυτές έχουν τον κατάλληλο χημικό τύπο και βρίσκονται στη σωστή θέση ώστε να καταλύουν την αντίδραση σύνδεσης με το υπόστρωμα, τότε η περιοχή σύνδεσης είναι μία ενεργός περιοχή.

Η ενεργός περιοχή ενός ενζύμου σύμφωνα με την Koshland περιλαμβάνει τις ομάδες σύνδεσης ή "ομάδες επαφής" και τις καταλυτικές ομάδες που διακρίνονται σε "βοηθητικές και συνεισφορές", οι οποίες συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της ενεργού περιοχής και συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην καταλυτική διεργασία.

#### IV.1.2. Συμπαράγοντες - Προσθετικές ομάδες

Πολλά ένζυμα για να δράσουν χρειάζονται μη πρωτεϊνικούς παράγοντες που ονομάζονται συμπαράγοντες και χωρίζονται σε δύο



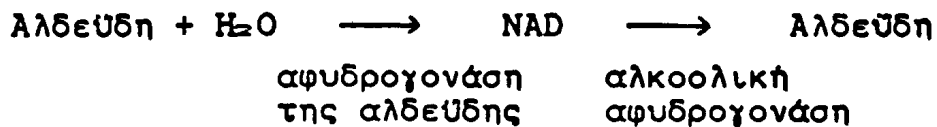
κατηγορίες:

- α) Στα ειδικά συνένζυμα, που είναι συνήθως οργανικά μόρια περίπλοκης δομής, τα οποία συχνά μεταφέρουν χημικές ομάδες και
- β) Στους ενεργοποιητές που είναι απλής φύσης, όπως π.χ. τα ιόντα μετάλλων.

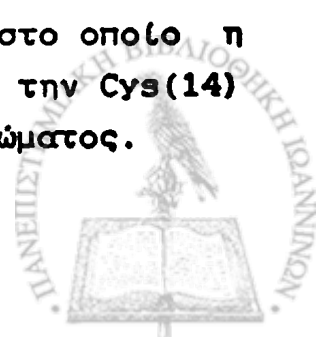
Τα συνένζυμα συνήθως δρουν σαν δέκτες ή δότες ηλεκτρονίων ή ακόμη ατόμων και ομάδων που μεταφέρονται κατά την ενζυμική αντίδραση. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν είτε σαν συνένζυμα είτε σαν υποστρώματα ανάλογα με το ενζυμικό σύστημα που μελετάται. Η δράση τους συνίσταται στην ένωση δύο ενζύμων και στο σχηματισμό ενός ενζυμικού συστήματος. Δηλαδή, κάποιο ένζυμο μεταφέρει μια ομάδα από το υπόστρωμα στο συνένζυμο και ένα άλλο μεταφέρει αυτή από το συνένζυμο σε ένα δεύτερο υπόστρωμα. Έτσι το συνένζυμο παίζει αφ' ενός μεν ρόλο συνένζυμου στην όλη ενζυμική πορεία, αφ' ετέρου δε ρόλο υποστρώματος στην κάθε ενζυμική αντίδραση χωριστά. Τυπικό παράδειγμα μιας τέτοιας πορείας αποτελεί η μετατροπή (αυτοοξειδοαναγωγή), δύο μορίων αλδεΐδης σε ένα μόριο οξέος και ένα αλκοόλης:



Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο "αλδεΐδομουτάση" με τη βοήθεια του συνενζύμου NAD. Η αλδεΐδική μουτάση αποτελείται από δυο δεϋδρογονάσεις, σε κάθε μια από τις οποίες το NAD παίζει το ρόλο του υποστρώματος.



Υπάρχουν περιπτώσεις που το συνένζυμο αποτελεί μέρος του ενζυμικού μορίου, συνδέεται δηλ. με το πρωτεϊνικό τμήμα με ομοιοπολικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύνδεση του συνενζύμου τότε μ' ένα ένζυμο και τότε με άλλο. Σ' αυτές τις περιπτώσεις το συνένζυμο ονομάζεται προσθετική ομάδα. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το κυτόχρωμα C, στο οποίο η προσθετική ομάδα, η αίμη, συνδέεται ομοιοπολικά με την Cys(14) και την Cys(17) της πεπτιδικής αλυσίδας του κυτοχρώματος.



Οι ενεργοποιητές που αποτελούν την δεύτερη κατηγορία είναι ορισμένα ιόντα μετάλλων. Συγκεκριμένα έχουν βρεθεί περίπου 15 ιόντα μετάλλων όπως π.χ.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  κ.α., και ένας πολύ μικρός αριθμός ανιόντων όπως  $\text{Cl}^{-2+}$ , τα οποία είναι απαραίτητα στα ένζυμα για την εκδήλωση της ενζυμικής τους δραστηριότητας.

Το σύμπλεγμα ενζύμου-συνενζύμου (ή προσθετικής ομάδας) ονομάζεται ολοένζυμο, και μόνο το πρωτεϊνικό μέρος αποένζυμο. Οι συμπάροντες είναι γενικά σταθεροί στη θερμοκρασία, μολονότι τα περισσότερα ένζυμα χάνουν την ενεργότητά τους με τη θέρμανση.

#### IV. 2. Ανίχνευση και χαρακτηρισμός των σημείων σύνδεσης του ενζύμου

Υπάρχει σήμερα στη διάθεση των ερευνητών μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων εξαιρετικά ευαίσθητων που συμβάλλουν στην ανίχνευση και μελέτη του ενεργού κέντρου των ενζύμων. Η μελέτη αυτών μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες στον ερευνητή, ώστε να εξακριβωθεί ποιά αμινοξέα είναι απαραίτητα ή όχι, για την εκδήλωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου.

Στη συνέχεια αναφέρονται μερικές από τις πλέον επίκαιρες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη και το χαρακτηρισμό του ενεργού κέντρου των ενζύμων.

##### IV. 2.1. Φωτομετρικές μέθοδοι

###### α) Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

Πολλές φορές οι φασματικές ιδιότητες του E, ή του S, ή και των δύο μεταβάλλονται όταν σχηματισθεί το σύμπλοκο ES, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια φασματοφωτομετρική μέθοδο για την παρακολούθηση της αντίδρασης. Για παράδειγμα εάν το υπόστρωμα ή το σύμπλοκο ή και τα δύο απορροφούν στη περιοχή του ορατού ή υπεριώδους, τότε επιλέγεται ένα



συγκεκριμένο μήκος κύματος στο οποίο, είτε η εξαφάνιση του υποστρώματος είτε η εμφάνιση του συμπλόκου ES, ακολουθείται από μία σημαντική μεταβολή στην απορρόφηση του φωτός. Έτσι παρακολουθείται ποσοτικά η πρόοδος της αντίδρασης, με απλή μέτρηση της μεταβολής στην απορρόφηση.

#### β) Πολωσιμετρικές μέθοδοι

Συχνά το υπόστρωμα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι οπτικά μη ενεργό και τα προϊόντα ενεργά ή και αντίστροφα. Επίσης μπορεί το υπόστρωμα να στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός προς την μία κατεύθυνση και τα προϊόντα προς την αντίθετη. Σε αυτές τις περιπτώσεις παρακολουθείται η πορεία της ενζυμικής αντίδρασης είτε με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού, (C.D.) είτε με της οπτικής στροφικής διασποράς (O.R.D.).

#### γ) Μέθοδοι φθορισμού

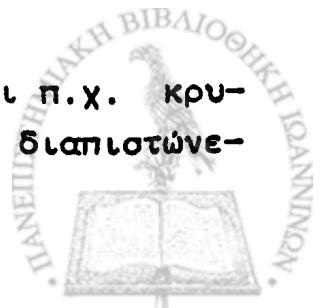
Με τη μέθοδο αυτή παρακολουθείται είτε ο φθορισμός που οφείλεται στα αμινοξέα Trp, Tyr και Phe, είτε ο φθορισμός που οφείλεται σε φθορίζουσες ομάδες που έχουν συνδεθεί με κάποιο τρόπο στην πρωτεΐνη.

### IV. 2.2. Μέθοδοι με ηλεκτρόδια

Στις περιπτώσεις που δεν μπορεί να εφαρμοσθεί καμία από τις παραπάνω τεχνικές, υπάρχει μία ποικιλία τύπων ηλεκτροδίων που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης. Τυπικά παραδείγματα τέτοιων τεχνικών αποτελούν το ηλεκτρόδιο υάλου<sup>27</sup> με το οποίο παρακολουθείται η μεταβολή του pH και το ηλεκτρόδιο οξυγόνου<sup>28</sup> με το οποίο παρακολουθείται η μεταβολή της συγκέντρωσης οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου.

### IV.2.3. Χημικές τροποποιήσεις

Όταν το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος είναι π.χ. κρυσταλλικό τότε με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας διαπιστώνε-

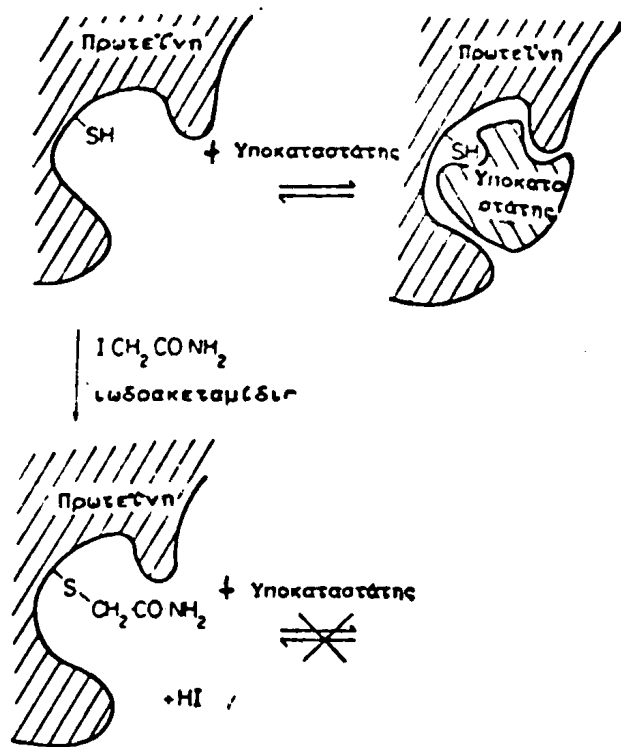


ται σχετικά εύκολα η δομή του σημείου σύνδεσης. Δυστυχώς όμως τέτοια σύμπλοκα δεν είναι πάντα εύκολο να σχηματισθούν και έτσι θα πρέπει να αναζητηθούν έμμεσοι τρόποι αναγνώρισης των αμινοξέων της ενεργού περιοχής. Οι τρόποι αυτοί στηρίζονται κατά κύριο λόγο στην παρακολούθηση της καταλυτικής δραστη- κότητας του ενζύμου, μετά απο χημική τροποποίηση παράπλευρων αλυσίδων συγκεκριμένων αμινοξέων στο μόριο του ενζύμου. Η στρατηγική αυτής της μεθοδολογίας στηρίζεται στο γεγονός ότι αν το ένζυμο χάσει τις καταλυτικές του ιδιότητες μετά από δέσμευση κάποιου αμινοξέος τότε θα πρέπει το αμινοξύ αυτό να βρίσκεται στην ενεργό περιοχή.

Σπάνια όμως μια χημική αντίδραση μπορεί να έχει σαν στόχο της ένα και μόνο αμινοξύ στο μόριο του ενζύμου. Συνήθως ένα χημικό αντιδραστήριο αντιδρά με όλα ή τα περισσότερα όμοια αμινοξέα του ενζύμου, ανεξάρτητα αν αυτά βρίσκονται στο σημείο σύνδεσης ή όχι. Επίσης είναι δυνατόν η τροποποίηση κάποιου ή κάποιων αμινοξέων που δεν αποτελούν μέρος του ενεργού κέντρου να ελαττώνει τη δραστηκότητα του ενζύμου λόγω πιθανής μεταβο- λής της διαμόρφωσης του μορίου.

Γι' αυτούς τους λόγους απαιτούνται περισσότερο πολύπλοκοι χειρισμοί. Η χημική τροποποίηση γίνεται π.χ. παρουσία και απουσία του υποστρώματος. Αν το υπόστρωμα προστατεύει το ένζυ- μο απο αδρανοποίηση, συγκριτικά με το αποτέλεσμα που προκαλεί η χημική τροποποίηση απουσία υποστρώματος, τότε οι πιθανότητες είναι μεγάλες να γίνεται η αντίδραση στην ενεργό περιοχή. Ένα τυπικό παράδειγμα αποτελεί το ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκερι- νολδαδεϋδοφωσφατάσης<sup>29</sup>, το οποίο μολονότι φέρει τέσσερις σουλφυδρυλομάδες ανα μονομερές, μετατρέπεται σε ανενεργό μόνο όταν μία συγκεκριμένη σουλφυδρυλομάδα αλκυλιωθεί. Συγκεκριμένα όταν στο ένζυμο προστεθεί πρώτα το ιωδοακεταμίδιο και μετά το υπόστρωμα η σουλφυδρυλομάδα του αλκυλιώνεται με αποτέλεσμα το ένζυμο να αδρανοποιείται. Αντιθέτως, αν το υπόστρωμα προστεθεί πριν το αλκυλιωτικό μέσο, το ένζυμο δεν αδρανοποιείται. Με άλλα λόγια "προστασία μέσω υποστρώματος" αποτελεί σαφή απόδειξη ότι η συγκεκριμένη σουλφυδρυλομάδα βρίσκεται στο ενεργό κέντρο.





Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός αντιδραστηρίων που αντιδρούν εκλεκτικά με τα διάφορα αμινοξέα. Η ιοτιδίνη, π.χ. αμινοξύ του ενεργού κέντρου της ριβονουκλεάσης, μπορεί αφ'ενός μεν πολύ εύκολα να αλκυλιωθεί με κατάλληλες αλλογονο-ενώσεις<sup>30</sup> λόγω της ιμιδαζολικής της ομάδας, αφ'ετέρου δε να αντιδράσει με διαζω-ενώσεις. Η τυροσίνη στο ένζυμο μηλική αφυδρογονάση μπορεί να τροποποιηθεί χημικά, είτε με αντιδράσεις που συμμετέχει η υδροξυλομάδα (ακετυλίωση, ακυλίωση)<sup>31</sup>, είτε με αντιδράσεις που συμμετέχει ο φαινολικός δακτύλιος (ιωδίωση, νίτρωση).

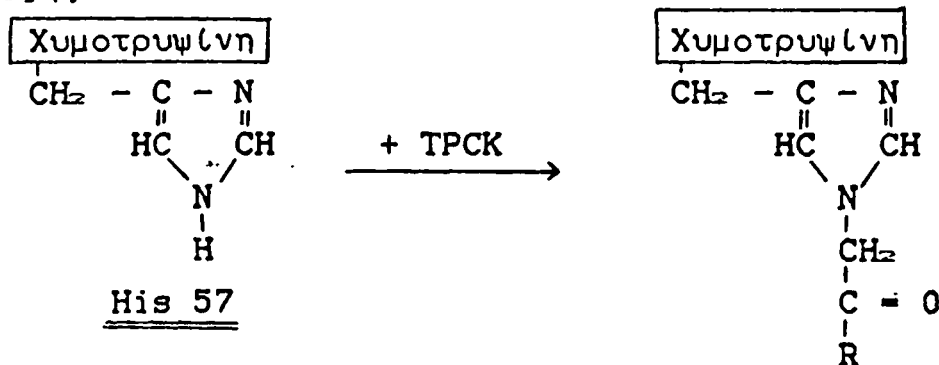
#### IV.3. Σήμανση λόγω συχθένειας (Affinity labelling)

Η εξειδίκευση που δείχνουν τα ένζυμα στη σύνδεσή τους με ενώσεις που έχουν παρόμοια δομή με το υπόστρωμα, χρησιμοποιείται και για τη σήμανση αμινοξέων της ενεργού περιοχής. Αυτό μπορεί να γίνει, αν μία τέτοια ένωση που "μοιάζει" με το υπόστρωμα διαθέτει επιπλέον και μία ομάδα που να αντιδρά με ομάδα της ενεργού περιοχής και να συνδέεται με αυτήν ομοιοπολικά. Πρωτεολυτική διάσπαση του ενζύμου, οδηγεί στην ανεύρεση του ενζύμου με την ομάδα σήμανσης προσκολλημένη σε κάποιο αμινοξύ της ενεργού περιοχής.



Οι Milstein και Sanger<sup>32</sup> εφάρμοσαν την τεχνική αυτή της "σήμανσης λόγω συγγένειας" (affinity labelling)<sup>33</sup> σε μια σειρά από πειράματα που έκαναν πάνω στη φωσφογλυκομουτάση, χρησιμοποιώντας 1-φωσφορική-γλυκόζη (που περιέχει P<sup>32</sup>) ως υπόστρωμα. Τα πειράματα έδειξαν ότι ο P<sup>32</sup> έχει συνδεθεί με σερίνη, πράγμα που σημαίνει ότι το αμινοξύ αυτό αποτελεί μέρος του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Μεγάλη επιτυχία της τεχνικής αυτής ήταν η εφαρμογή της στα ένζυμα χυμοτρυψίνη και τρυψίνη από τον Show και τους συνεργάτες του<sup>34</sup>. Αυτοί διαπίστωσαν ότι η ένωση τοσυλο-L-φαιλυλαλανινοχλωρομεθυλοκετόνη (TPCK) διαθέτει: α) μία αρωματική ομάδα που αναγνωρίζεται από τη χυμοτρυψίνη και β) μία χλωρομεθυλική ομάδα για αντίδραση. Όταν το TPCK συνδεθεί στην ενεργό περιοχή της χυμοτρυψίνης τότε η χλωρομεθυλική ομάδα πλησιάζει την His(57). Η αντίδραση και η ομοιοπολική σύνδεση του αντιδραστήριου με την His(57), οδηγεί στη σήμανση και στην απόδειξη της συμμετοχής του αμινοξέος αυτού, στην ενεργό περιοχή της χυμοτρυψίνης. Αν παρασταθεί με RCOCH<sub>2</sub>Cl το TPCK η αντίδραση είναι η εξής:



#### IV.4. Επαγωγικό φαινόμενο

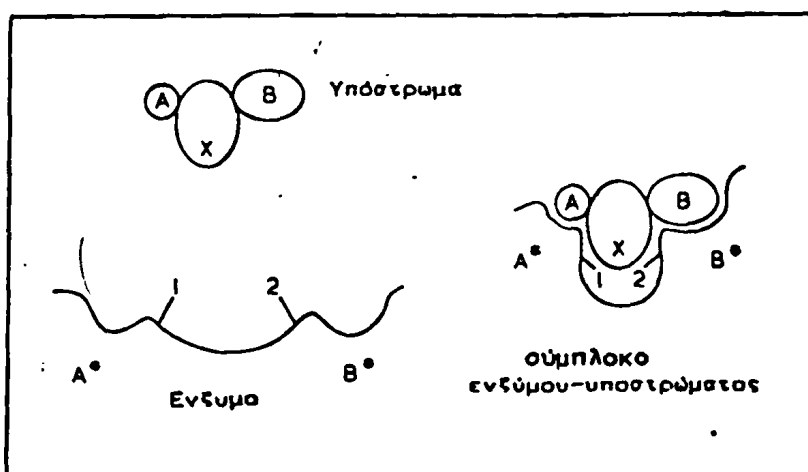
Μολονότι η θεωρία Fischer βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση και εξήγηση πολλών ενζυμικών φαινομένων, υπήρξαν όμως και ορισμένες παρατηρήσεις, οι οποίες αποδείχθηκε δύσκολο να εξηγηθούν. Έτσι διαπιστώθηκαν πολλές περιπτώσεις κατά τις οποίες η δέσμευση του υποστρώματος επέφερε αλλαγή στη τρισδιάστατη δομή του ενζύμου. Αυτό συμβαίνει επειδή η δυναμική των





βιολογικών μορίων είναι συνισταμένη πολλών αλληλοαναιρούμενων δυνάμεων. Έτσι μια μικρή αλλαγή στο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει μία επαναδιευθέτηση της δομής του ενζύμου. Τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών έχουν παρατηρηθεί και μελετηθεί με τη βοήθεια φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού (C.D) οπτικής στροφικής διασποράς (O.R.D.) κ.α.

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις ο Koshland<sup>33,34</sup> το 1959 πρότεινε τη θεωρία της "επαγόμενης προσαρμογής" (induced fit). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου επάγεται από το υπόστρωμα καθώς το τελευταίο πλησιάζει στην ενεργό περιοχή. Με άλλα λόγια η επαγωγή προκαλεί κατάλλη-



Σχήμα 14. Πρότυπο της επαγόμενης προσαρμογής

λο προσανατολισμο των καταλυτικών ομάδων που είναι απαραίτητες για την ενζυμική δράση. Αυτό φαίνεται καθαρά στο σχήμα 14 όπου για να μπορέσουν τα αμινοξέα 1 και 2 να αντιδράσουν με το τμήμα -X- του υποστρώματος, θα πρέπει ένζυμο και υπόστρωμα να λάβουν τέτοια θέση στο χώρο, ώστε να γίνουν οι ειδικές συνδέσεις μεταξύ των συμπληρωματικών τμημάτων A-A\* και B-B\*.

Η θεωρία της επαγόμενης προσαρμογής επαληθεύτηκε σε πολλά ένζυμα όπως η καρβοξυπεπτιδάση, ελαστάση, λυσοζύμη. Με τη βοήθεια των ακτίνων -X- παρατηρήθηκε στην καρβοξυπεπτιδάση-A<sup>37</sup> ότι η σύνδεση του υποστρώματος προκαλεί μετακίνηση της Tyr(248) κατά 12 Å. Η Tyr(248) αποτελεί μέρος της ενεργού περιοχής του ενζύμου. Αντίθετα στη χυμοτρυψίνη<sup>38</sup> παρατηρήθηκε



πολύ μικρή μεταβολή στη διαμόρφωση ύστερα από σύνδεση με το υπόστρωμα. Αυτό σημαίνει ότι σε ορισμένα ένζυμα η ενεργός περιοχή είναι προσχηματισμένη ή σχεδόν προσχηματισμένη ενώ σε άλλα η ενεργός διαμόρφωση επάγεται με τη σύνδεση του υποστρώματος.

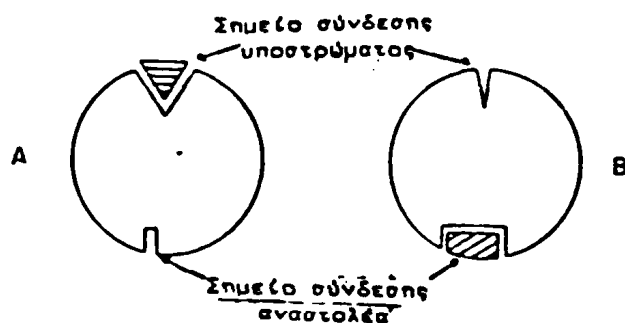
#### IV.5. Ενεργό κέντρο και αλλοστερικά σημεία σύνδεσης

Μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις της Βιοχημείας των τελευταίων χρόνων, αφορά τις γνώσεις στον τομέα των αλλοστερικών ενζύμων.

Πολλά ένζυμα διαπιστώθηκε ότι δρούν σε ενώσεις που δεν είναι ανάλογες των υποστρωμάτων τους, και προφανώς δεσμεύονται σε διαφορετική περιοχή του ενζύμου απ'ότι το υπόστρωμα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε πολλές βιοχημικές πορείες, όπως π.χ. η βιοχημική πορεία που οδηγεί στη σύνθεση της ισολευκίνης από τη θρεονίνη, το τελικό προϊόν, π.χ. η ισολευκίνη, είναι ειδικός αναστολέας του ενζύμου που καταλύει την πρώτη στη σειρά αντίδραση<sup>39</sup>.

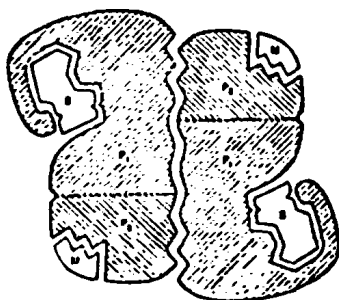
Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν τους Monod, Changeux και Jacob<sup>40</sup> το 1963 στη διατύπωση της έννοιας του "αλλοστερικού τροποποιητή" για να περιγράψουν ρυθμιστικά μόρια, όπως την L-ισολευκίνη, που αναστέλλουν ή ενεργοποιούν, ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Κατά τους ερευνητές αυτούς ο αλλοστερικός τροποποιητής δεσμεύεται αμφίδρομα στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, που μπορεί να είναι όχι μόνο μακριά από το ενεργό κέντρο αλλά και σ'άλλη υπομονάδα. Η δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-αλλοστερικού τροποποιητή δεν ενεργοποιεί μια αντίδραση που επηρεάζει τον ίδιο τον τροποποιητή, αλλά προκαλεί μια μικρή αλλά σαφή και αμφίδρομη τροποποίηση στη διαμόρφωση του ενζύμου, που λέγεται αλλοστερική μετάπτωση. Η μετάπτωση αυτή μεταβάλλει τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, επηρεάζοντας μια ή περισσότερες κινητικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την καταλυτική δράση του συγκεκριμένου ενζύμου.





**Σχήμα 15.** Σχηματική παράσταση αλλοστερικού ενζύμου με δεσμευμένο υπόστρωμα A , και δεσμευμένο αναστολέα B .

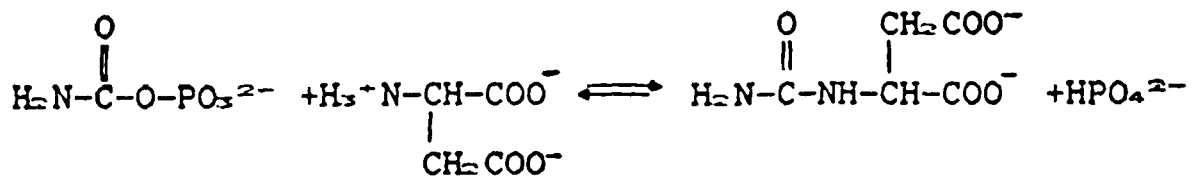
Τα αλλοστερικά ένζυμα είναι συνήθως μεγαλύτερου μοριακού βάρους, περισσότερο περίπλοκης δομής και συχνά πιο δύσκολος ο καθαρισμός τους συγκρινόμενα με τα μή αλλοστερικά ένζυμα. Αυτό οφείλεται στο ότι όλα σχεδόν τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από υπομονάδες, που κάθε μία μπορεί να αποτελείται από μια ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η ενεργός περιοχή του ενζύμου μπορεί να βρίσκεται στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα με την αλλοστερική περιοχή ή σε διαφορετική. Τα αλλοστερικά ένζυμα παρουσιάζουν συνήθως ανώμαλη και πολύπλοκη κινητική συμπεριφορά.



**Σχήμα 16.** Σχηματική παράσταση αλλοστερικού ενζύμου που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα από δυο πολυπεπίδια  $P_1$  και  $P_2$ . Στο  $P_1$  βρίσκεται η ενεργός περιοχή και στο  $P_2$  η αλλοστερική περιοχή για τον τροποποιητή  $M^{+2}$ .

Ένα τυπικό παράδειγμα αλλοστερικού ενζύμου είναι η ασπαρτική τρανοκάρβαμυλάση<sup>42, 43</sup> (ACTase) που καταλύει την αντίδραση:





Η αντίδραση αυτή είναι η πρώτη, μιας σειράς βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στη σύνθεση του κυτιδινοτριφωσφορικού οξέος (CTP). Το κυτιδινοτριφωσφορικό οξύ είναι συγχρόνως και το τελικό προϊόν, και ο αλλοστερικός αναστολέας του αρχικού ενζύμου, μολονότι έχει πολύ μικρή δομική ομοιότητα με το υπόστρωμα του ενζύμου.

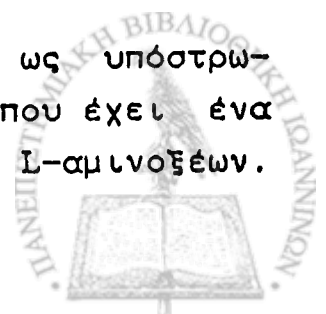
#### IV.6. Εξειδίκευση

Δύο είναι τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των ενζύμων: η εξειδίκευση και η καταλυτική τους ισχύς. Ο όρος εξειδίκευση σημαίνει την ικανότητα ενός ενζύμου να καταλύει μία καθορισμένη ενζυμική αντίδραση και να διακρίνει μεταξύ πολλών υποστρωμάτων που συναγωνίζονται για το ενεργό του κέντρο. Διακρίνονται οι παρακάτω τρεις περιπτώσεις ενζυμικής εξειδίκευσης:

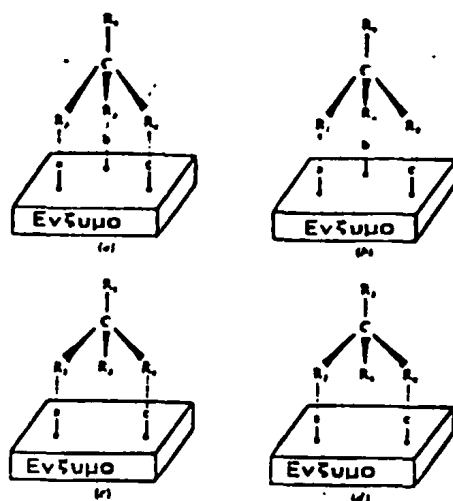
α) "Εξειδίκευση αντίδρασης": Το ένζυμο καταλύει ένα ειδικό τύπο αντίδρασης, π.χ. μπορεί να καταλύει την οξειδωση των πρωτοταγών αλκοολών σε αλδεΐδες.

β) "Εξειδίκευση υποστρώματος", που διακρίνεται σε απόλυτη, υψηλή και χαμηλή. Ενζυμα με απόλυτη εξειδίκευση είναι εκείνα που δρουν αποκλειστικά σε ένα μόνο υπόστρωμα π.χ. η ουρεάση υδρολύει μόνο την ουρία. Ενζυμα με υψηλή εξειδίκευση αλληλεπιδρούν με ένα μικρό αριθμό υποστρωμάτων. Η 2-μονοοξυγονάση της φαινόλης π.χ. οξειδώνει όχι μόνο τη φαινόλη αλλά και την ρεσορκίνη και την ο-κρεσόλη. Τέλος ένζυμα με χαμηλή εξειδίκευση είναι εκείνα που δρουν σε ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, π.χ. οι φωσφατάσες, εστεράσες κ.λ.π. υδρολύουν μια μεγάλη ποικιλία φωσφορικών και καρβοξυλικών εστέρων.

γ) "Στερεοχημική εξειδίκευση": Πολλά ένζυμα έχουν ως υπόστρωμα ένα από τα δύο πιθανά ισομερή μιας ουσίας που έχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα, όπως π.χ. η οξειδάση των L-αμινοξέων.



Ο Ogston<sup>44</sup> ήταν ο πρώτος που ερμήνευσε το φαινόμενο με τη θεωρία των τριών σημείων επαφής μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, δεχόμενος ότι το ένζυμο διαθέτει τις περιοχές a, b, c (σχ.17) που εφάπτονται με τις ομάδες R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> και R<sub>4</sub> αντίστοιχα του ασύμμετρου μορίου του υποστρώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν και οι δύο οπτικά εναντιομερείς ενώσεις να αλληλεπιδράσουν με το ένζυμο (σχ.17 a, b). Εάν υπήρχαν μόνο 2 σημεία σύνδεσης μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, τότε θα μπορούσαν και οι δύο μορφές να παίξουν το ρόλο του υποστρώματος (σχ. 17 c, d).



Σχήμα 17. Σχηματική παράσταση της υπόθεσης των τριών σημείων.

Η υπόθεση "των τριών σημείων επαφής" εφαρμόσθηκε ευρέως από τους μετέπειτα ερευνητές για να εξηγήσουν μια σειρά από φαινόμενα, όπως η εξειδίκευση που παρουσιάζουν οι δεϋδρογονάσες τόσο σε σχέση με το υπόστρωμα, όσο και σε σχέση με το συνένζυμο που χρησιμοποιούν. Επίσης εφαρμόσθηκε για την ανίχνευση-χαρακτηρισμό του ενεργού κέντρου των ενζύμων, όπως παπάλνη<sup>45</sup>, ελαστάση<sup>46</sup>, καρβοξυπεπτιδάση<sup>47</sup> κ.α.

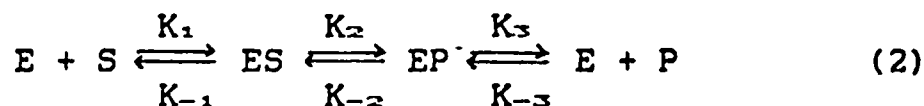


## V. Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων

Η κινητική των ενζύμων είναι ο κλάδος της Ενζυμολογίας που ασχολείται με τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι περισσότερο σημαντικοί παράγοντες είναι η συγκέντρωση των E, S, P, I, το pH, η ιοντική ισχύς και η θερμοκρασία. Η μελέτη των παραγόντων αυτών δίνει πληροφορίες για τον τρόπο δράσεως των ενζύμων και τις συνθήκες που απαιτούνται σε κάθε ενζυμική ανάλυση.

### V.1. Ενζυμικές αντιδράσεις ενός υποστρώματος -Εξίσωση Michaelis-Menten

Η απλούστερη ενζυμική αντίδραση περιλαμβάνει ένα υπόστρωμα S, ένα προϊόν P,

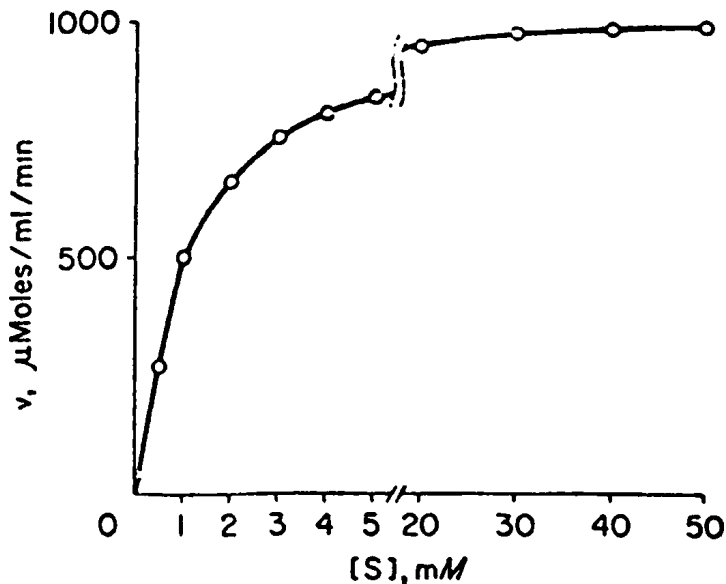


ενώ τα ES και EP ονομάζονται ενδιάμεσα σύμπλοκα (central complexes).

Το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας U με τη συγκέντρωση του υποστρώματος S για ένα μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων είναι ορθογώνια υπερβολή (σχ.18) και χωρίζεται σε τρεις σαφείς περιοχές:

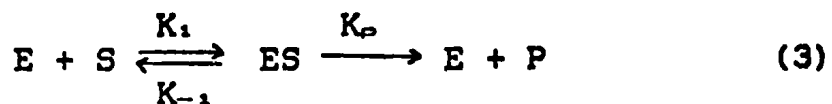
- περιοχή μικρών συγκεντρώσεων όπου η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.
- Περιοχή υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος όπου η ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του τελευταίου.
- Ενδιάμεση περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης ούτε σταθερή είναι, ούτε αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.





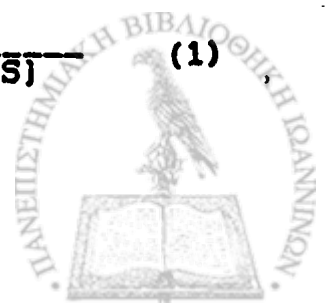
**Σχήμα 18.** Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης  $V$  σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ .

Για να εξηγήσουν την κινητική αυτή συμπεριφορά ο Henri (1902)<sup>48</sup> και εν συνεχεία οι Michaelis και Menten (1913)<sup>49</sup>, πρότειναν ότι η ενζυμική κατάλυση προχωρεί με σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES), που γίνεται πριν από τη διάσπαση του υποστρώματος. Επιπλέον αν η μελέτη του συστήματος γίνεται σε πολύ αρχικά στάδια της αντίδρασης, όπου το ποσο των προϊόντων που δημιουργούνται είναι πολύ μικρό συγκριτικά με το ποσό του υποστρώματος που υπάρχει, η εξίσωση (2) απλοποιείται και παίρνει τη μορφή:



Η απλούστερη μέθοδος προσδιορισμού της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης είναι η μέθοδος της ταχείας ισορροπίας (rapid equilibrium). Σύμφωνα με αυτή τα E,S και ES ισορροπούν πολύ γρήγορα σε σχέση με την ταχύτητα διάσπασης του ES προς E,P, ώστε η τιμή του  $k_p$  να γίνεται αμελητέα. Με αυτή την παραδοχή οι Michaelis και Menten κατέληξαν στην εξίσωση:

$$\frac{U}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad \text{ή} \quad \frac{U}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (1)$$



όπου  $U$  = ταχύτητα της αντίδρασης για κάθε χρονική στιγμή  
 $V_{max}$  = η μέγιστη ταχύτητα που παρατηρείται όταν όλο το έν-  
ζυμο έχει μετατραπεί σε  $ES$ .  
 $K_s = K_{-1}/K_1$  = σταθερά διάστασης του συμπλόκου  $ES$ .

Η εξίσωση ταχύτητας (1) ισχύει υπό την προϋπόθεση ότι η ταχύ-  
τητα  $U$  αναφέρεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, οπότε η  
συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$  παραμένει βασικά σταθερή, δη-  
λαδή δεν θα πρέπει να έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από το  
5% του υποστρώματος.

Οι Briggs και Haldane<sup>20</sup> έκαναν μία διαφορετική προσέγγι-  
ση από αυτή των Michaelis και Menten, και δέχτηκαν ότι πολύ  
γρήγορα από τη στιγμή που θα αρχίσει η αντίδραση, δημιουργεί-  
ται μια σταθερή κατάσταση, έτσι ώστε ο ρυθμός μεταβολής της  
συγκέντρωσης του συμπλόκου  $ES$  σε συνάρτηση με τον χρόνο να  
είναι μηδέν, δηλ.  $d[ES]/dt=0$ . Η εξίσωση που κατέληξαν είναι:

$$\frac{U}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \text{ή} \quad \frac{U}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (2) \quad \text{όπου } K_m = \frac{K_{-1} + K_p}{K_1}$$

Η σταθερά  $K_m$  είναι μια δυναμική σταθερά ψευδο-ισορροπίας, που  
εκφράζει τη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της σταθεράς  
κατάστασης παρά των συγκεντρώσεων ισορροπίας. Εάν το  $K_p$  είναι  
πολύ μικρό τότε  $K_m = K_s$ . Όταν  $[S] = K_m$  τότε από την εξίσωση (2)  
προκύπτει  $U = 1/2 V_{max}$ , δηλαδή η σταθερά Michaelis  $K_m$  αντι-  
στοιχεί σ' εκείνη τη συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία  
η ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης γίνεται ίση με το ήμισυ  
της μέγιστης ταχύτητας.

### Η σημασία του προσδιορισμού του $K_m$

Ο προσδιορισμός της τιμής του  $K_m$  είναι ιδιαίτερα σημαντι-  
κός για τους εξής λόγους:

α) Το  $K_m$  καθορίζει μια σχετική τιμή του ενδοκυτταρικού  
επίπεδου του υποστρώματος. Είναι λοιπόν σημαντικό να γνωρίζου-  
με εάν αυτό το επίπεδο είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο του  $K_m$ .





Εάν  $[S] \ll K_m$  τότε η ταχύτητα  $U$  θα είναι πολύ ευαισθητη στις αλλαγές του  $[S]$ , αλλά το μεγαλύτερο μέρος του καταλυτικού δυναμικού του ενζύμου θα δαπανάται επειδή  $U \ll V_{max}$ . Δεν θα υπάρχει επίσης φυσιολογική έννοια όταν  $[S] \gg K_m$  επειδή το  $U$  δεν θα μπορεί να ξεπεράσει το  $V_{max}$ , και η διαφορά μεταξύ του  $U$  για  $[S] = K_m$ , και του  $U$  για  $[S] = 1000 K_m$  θα είναι μόνο διπλάσια. Επίσης για  $[S] \gg K_m$ , η  $U$  δεν θα παρουσιάζει ευαισθησία σε μικρές αλλαγές του  $[S]$ .

β) Επειδή το  $K_m$  είναι σταθερό για δεδομένο ένζυμο, η αριθμητική του τιμή προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης ενζύμων από διαφορετικούς οργανισμούς ή από διαφορετικούς ιστούς του ίδιου οργανισμού ή από τον ίδιο ιστό σε διαφορετικές καταστάσεις εξέλιξης.

γ) Εάν το  $K_m$  που προσδιορίζεται "in vitro" είναι πολύ υψηλό, (έξω από τα φυσιολογικά επίπεδα) τότε πρέπει να ερευθούν ενεργοποιητές που λειτουργούν "in vivo" και μειώνουν το  $K_m$ . Μετρώντας την επίδραση των διαφορετικών συστατικών πάνω στο  $K_m$  μπορούν να αναγνωρισθούν σπουδαίοι αναστολείς.

δ) Εάν είναι γνωστό το  $K_m$  τότε μπορούν να ρυθμιστούν οι συνθήκες του πειράματος ώστε  $[S] \gg K_m$  και έτσι να προσδιορισθεί το  $V_{max}$ , το οποίο αποτελεί μια ένδειξη για το  $[E]_0$  (αρχική συγκέντρωση  $E$ ).

ε) Η σταθερά Michaelis δείχνει τη σχετική καταλληλότητα διαφορετικών υποστρωμάτων ενός ενζύμου: Αυτό σημαίνει, ότι το υποστρώμα με το μικρότερο  $K_m$  έχει την υψηλότερη φαινομενική συγγένεια με το ένζυμο. Το καλύτερο υποστρώμα είναι αυτό που έχει το μεγαλύτερο λόγο  $V_{max}/K_m$ .

Τέλος η τιμή της σταθεράς  $K_m$  εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, τη δομή του υποστρώματος και έχει διαστάσεις  $\text{mol.l}^{-1}$ .

### Διερεύνηση της εξίσωσης Michaelis-Menten

Η διερεύνηση της εξίσωσης Michaelis-Menten οδηγεί σε ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα:

α) Αν  $[S] \ll K_m$  τότε η εξίσωση απλοποιείται σε

$$U = \frac{V_{max}}{K_m} [S]$$



και επειδη  $V_{max}/K_m$  = σταθερό, η αντίδραση είναι πρώτης τάξης. Η γραμμική αυτή σχέση ισχύει όταν  $[S] < 1/10 K_m$ .

β) Αν  $[S] \gg K_m$  τότε η εξίσωση απλοποιείται σε  $U = V_{max}$ , δηλαδή η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μέγιστη και ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Η αντίδραση, επομένως είναι μηδενικής τάξης. Η σχέση αυτή ισχύει όταν  $[S] \gg 10 K_m$ .

γ) Όταν οι τιμές  $[S]$  κυμαίνονται στην περιοχή  $0,1 K_m - 10 K_m$ , οι απλές προσεγγίσεις δεν ισχύουν και η αντίδραση είναι μικτής τάξης.

## V.2. Μέθοδοι γραφικής απεικόνισης ενζυμικών κλητηικών δεδομένων

Απο το σχήμα 18 που είναι η γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί με ακρίβεια η  $V_{max}$  επειδή η τιμή αυτή προσεγγίζεται μόνο ασυμπτωματικά σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να προσδιορισθεί ούτε το  $K_m$ . Γι' αυτό έχουν γίνει προσπάθειες μετασχηματισμού της εξίσωσης Michaelis-Menten σε περισσότερο εύχρηστες μορφές.

### V.2.1. Γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk

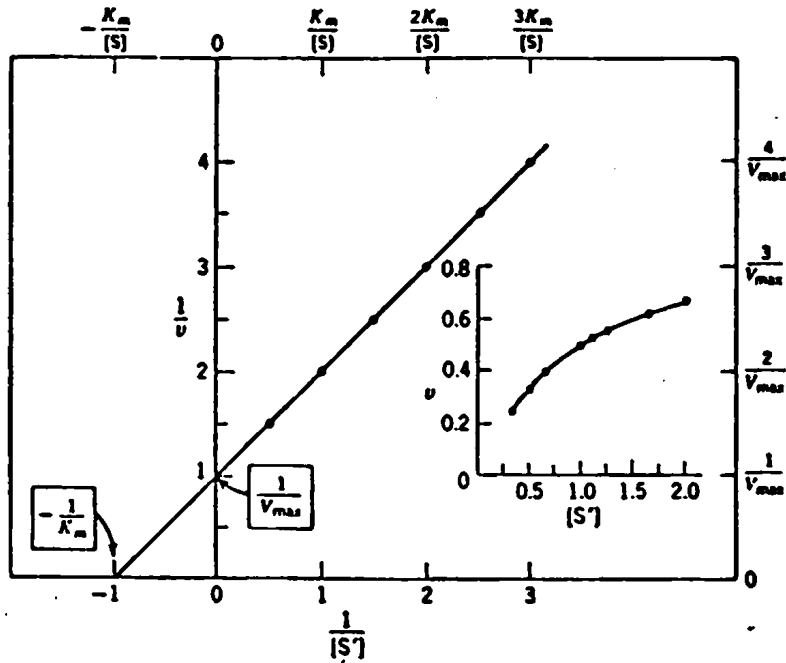
Το 1934 οι Lineweaver και Burk<sup>32</sup> πρότειναν μια απλή αναστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten οπότε προκύπτει η σχέση:

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

που είναι του γενικού τύπου  $y = a + bx$  και δίνει ευθύγραμμα διαγράμματα.

Έτσι το διάγραμμα  $1/U$  προς  $1/[S]$  είναι ευθεία γραμμή, η οποία τέμνει τον  $1/U$  άξονα στο σημείο  $1/V_{max}$  και τον  $1/[S]$  άξονα στο σημείο  $-1/K_m$  και έχει κλίση  $K_m/V_{max}$  (σχ.19).





Σχήμα 19. Διάγραμμα Lineweaver-Burk

### V.2.2. Γραφική παράσταση των Hanes-Woolf

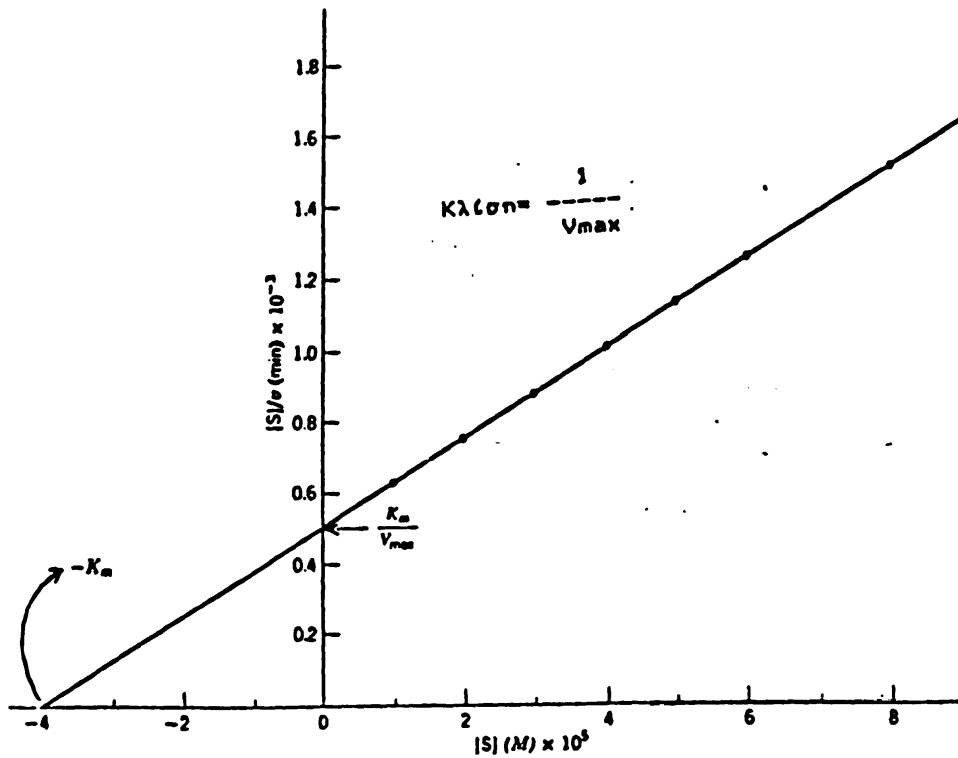
Η προηγούμενη μέθοδος γραφικού προσδιορισμού των σταθερών  $V_{max}$  και  $K_m$ , που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του "διπλού αντιστρόφου", έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Το πιο σημαντικό απ' αυτά είναι ότι μικρά σφάλματα που παρατηρούνται σε μεγάλες αραιώσεις υποστρώματος πολλαπλασιάζονται με τη μέθοδο αυτή, και μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένη κλίση της ευθείας γραμμής. Λόγω των μειονεκτημάτων της γραφικής παράστασης των Lineweaver-Burk έχουν επινοηθεί και άλλες μέθοδοι.

Μια τέτοια μέθοδος είναι η γραφική παράσταση Hanes-Woolf<sup>22</sup> που βασίζεται στην εξίσωση:

$$\frac{[S]}{U} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (4)$$

και η οποία προκύπτει, εάν την εξίσωση Lineweaver-Burk την πολλαπλασιάσουμε με  $[S]$ . Το διάγραμμα  $[S]/U$  προς  $[S]$  είναι ευθεία γραμμή, η οποία τέμνει τον άξονα του  $[S]$  στο σημείο  $-K_m$  και τον άξονα του  $[S]/U$  στο σημείο  $K_m/V_{max}$ , έχει δε κλίση  $1/V_{max}$ .





Σχήμα 20. Διάγραμμα Hanes-Woolf.

V.2.3. Γραφική παράσταση των Woolf-Augustisson-Hofstec

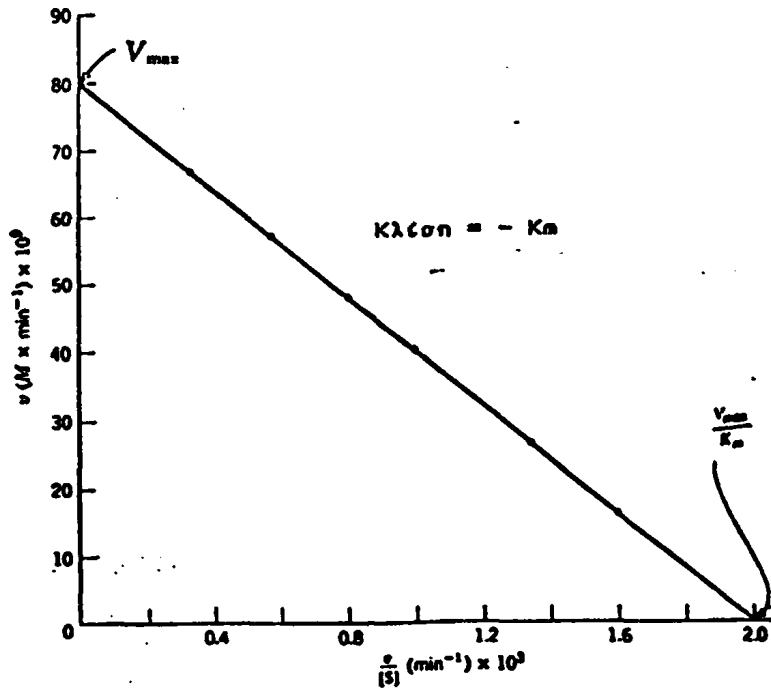
Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εξίσωση:

$$U = -K_m \frac{U}{[S]} + V_{max} \quad (5)$$

οπότε η γραφική παράσταση της εξίσωσης είναι της μορφής  $U=f(U/[S])$ .

Η κλίση της ευθείας είναι  $-K_m$ , το σημείο τομής με τον άξονα  $U$  είναι το  $V_{max}$ , και με τον άξονα  $U/[S]$  είναι το  $V_{max}/K_m$ .





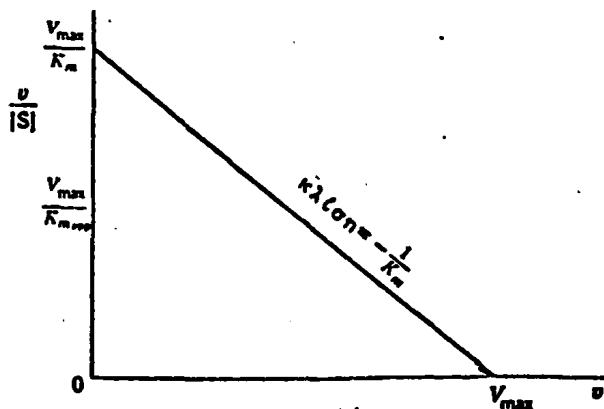
Σχήμα 21. Διάγραμμα Woolf-Augustissson-Hofstee.

V.2.4. Γραφική παράσταση των Eadie-Scatchard

Ένας άλλος γραφικός μετασχηματισμός της εξίσωσης Michaelis-Menten είναι ο εξής:

$$\frac{U}{[S]} = -\frac{1}{K_m} U + \frac{V_{max}}{K_m}$$

Το διάγραμμα  $U/[S]$  προς  $U$ , γνωστό σαν Eadie-Scatchard, δίνει ευθεία με κλίση  $-1/K_m$ , η οποία τέμνει τον άξονα  $U/[S]$  στο σημείο  $V_{max}/K_m$  (σχήμα 22).



Σχήμα 22. Διάγραμμα Eadie-Scatchard



θα πρέπει να επισημανθεί όμως ότι και αυτοί οι μετασχηματισμοί συγκρινόμενοι με αυτόν που πρότειναν οι Lineweaver-Burk δεν είναι χωρίς μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο είναι, ότι οι τιμές της ταχύτητας  $U$  που υπόκεινται σε μεγαλύτερα σφάλματα απ'ότι εκείνες της συγκέντρωσης του υποστρώματος  $[S]$ , εμφανίζονται και στις δυο συντεταγμένες.

#### V.2.5. Περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος

Ένα πολύ σημαντικό σημείο είναι ότι σε όλες τις μελέτες θα πρέπει οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος να βρίσκονται κοντά στην περιοχή του  $K_m$ . Εάν οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερες του  $K_m$  ( $[S] \gg K_m$ ) τότε το διάγραμμα του  $1/U = f(1/[S])$  θα είναι ευθεία. Αυτό θα επιτρέψει τον προσδιορισμό του  $V_{max}$ , αλλά όχι την κλίση που θα είναι μηδέν. Κατά συνέπεια θα είναι δύσκολο να προσδιορισθεί το  $K_m$ . Εάν  $[S] \ll K_m$  τότε τα σημεία τομής με τον άξονα του  $1/U$  και με τον άξονα του  $1/[S]$  θα είναι πολύ κοντά στο μηδέν και έτσι δεν θα μετρηθούν με ακρίβεια τα  $1/V_{max}$  και  $-1/K_m$ .

#### V.3.1. Επίδραση του pH στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων

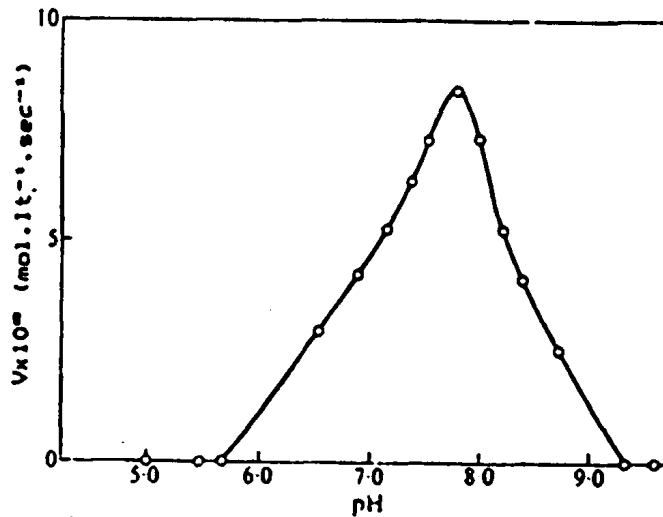
Τα ένζυμα όπως όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν ομάδες που μπορούν να φορτισθούν θετικά ή αρνητικά ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος.

Τα περισσότερα ένζυμα έχουν ένα χαρακτηριστικό βέλτιστο pH (optimum pH) στο οποίο η ενεργότητά τους είναι η μέγιστη δυνατή<sup>34</sup> (σχήμα 23).

Η σχέση pH—ενεργότητας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- α) η επίδραση του pH στη διαμόρφωση του ενζύμου, β) η επίδραση του pH στη σύνδεση ενζύμου—συνενζύμου ή προσθετικής ομάδας, γ) η επίδραση του pH στις ομάδες υποστρώματος που ιονίζονται και δ) επίδραση του pH στη σύνδεση ενζύμου—υποστρώματος.





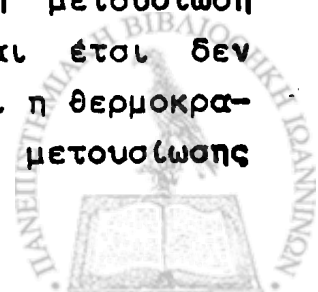
**Σχήμα 23.** Επίδραση του pH στην καταλυτική δραστηριότητα ενός ενζύμου.

Το pH του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος ενός ενζύμου δεν είναι απαραίτητα και το βέλτιστο pH για τη δράση του. Εξάλλου είναι φανερό πως μεταβολή του ενδοκυτταρικού pH μπορεί να έχει ευνοϊκή ή δυσμενή επίπτωση στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης. Επομένως μεταβολές του ενδοκυτταρικού pH μπορεί να ασκούν ρυθμιστική δράση στην ενεργότητα ενός ενζύμου.

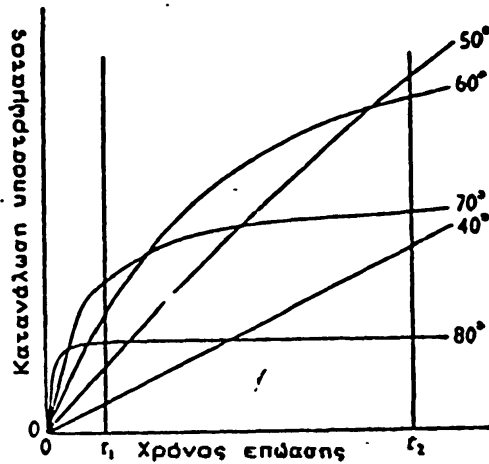
V.3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας στη ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων.

Εάν προσδιορισθεί η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία θα ληφθεί μια καμπύλη αντίστοιχη του σχήματος 23 περίπου, όπου η τετμημένη είναι η θερμοκρασία αντί του pH. Παρατηρείται δηλαδή ότι για κάθε ένζυμο υπάρχει μια βέλτιστη θερμοκρασία, στην οποία η ενεργότητα του ενζύμου γίνεται μέγιστη.

Ο πρώτος που ερμήνευσε το φαινόμενο ήταν ο Tammann<sup>33</sup> ο οποίος δέχτηκε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει δύο ανεξάρτητες διεργασίες και συγκεκριμένα, την καταλυόμενη αντίδραση από τη μια μεριά, και τη θερμική μετουσίωση από την άλλη. Σε μικρές θερμοκρασίες περίπου μέχρι 40°C, η μετουσίωση των περισσότερων ενζύμων γίνεται πολύ αργά, και έτσι δεν επιδρά στην ταχύτητα της αντίδρασης. Όσο μεγαλώνει η θερμοκρασία τόσο και πιο μεγάλη γίνεται η συμμετοχή της μετουσίωσης



του ενζύμου. Πάνω μάλιστα από τους  $60^{\circ}$  με  $70^{\circ}\text{C}$  για τα περισσότερα ένζυμα ο ρυθμός της μετασώσεως είναι πολύ μεγαλύτερος, από το ρυθμό της ίδιας της αντίδρασης που για πρακτικούς λόγους μηδενίζεται. Το σχήμα 24 δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας στην κίνητική μιας ενζυμικής αντίδρασης.



Σχήμα 24. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δράση ενός ενζύμου σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης.



## VI. Ενζυμική αναστολή

Κάθε μόριο που με την παρουσία του ελαττώνει την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας αναστολέας (inhibitor) της αντίδρασης αυτής. Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας είναι από τους κύριους ρυθμιστικούς παράγοντες των ζωντανών κυττάρων και μια από τις σημαντικότερες διαγνωστικές πορείες των ενζυμολόγων. Μελέτες αναστολής συχνά δίνουν πληροφορίες για την εξειδίκευση των ενζύμων, την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου και το μηχανισμό της κινητικής αντίδρασης.

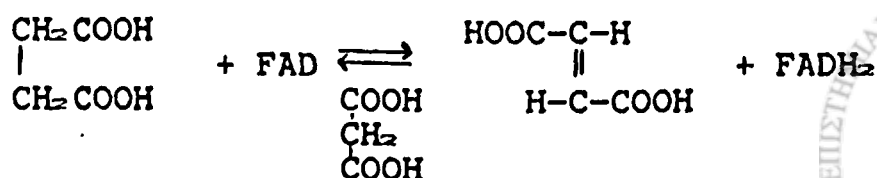
Στην καθημερινή μας ζωή αναστολείς ενζύμων απαντώνται σε πολλά φάρμακα και τοξικές ουσίες. Η χρήση συνθετικών ή φυσικών αναστολέων βρίσκει εφαρμογές στην Κλινική θεραπευτική και αποτελεί ένα κλάδο που υπόσχεται πολλά.

Άμέσως παρακάτω εξετάζονται οι τρεις βασικοί τύποι ενζυμικής αναστολής, με την προϋπόθεση ότι μόνο ένα απλό υπόστρωμα παίρνει μέρος σε κάθε αντίδραση και ότι μόνο ένα είδος αναστολής συνυπάρχει ανά πάσα στιγμή.

### VI.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

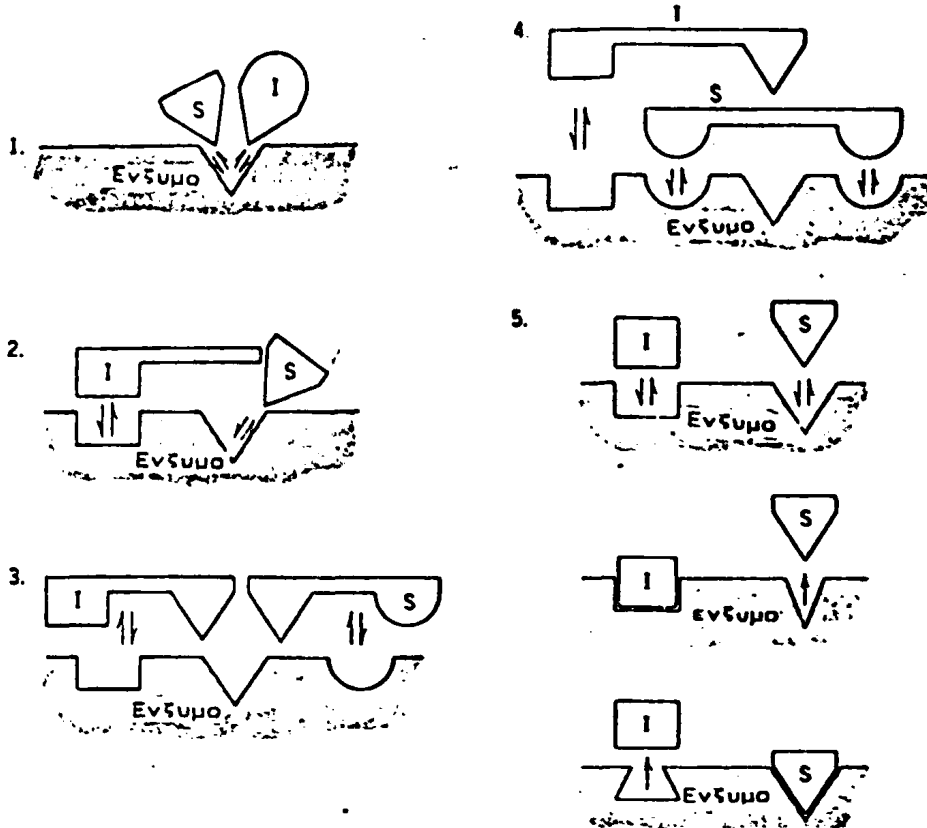
Συναγωνιστικός αναστολέας<sup>34</sup> είναι μια ουσία, που συνδέεται με το ελεύθερο ένζυμο με τέτοιο τρόπο ώστε να εμποδίζει τη σύνδεση του με το υπόστρωμα. Αυτό σημαίνει ότι ο αναστολέας και το υπόστρωμα παρουσιάζουν αμοιβαία αποκλειστικότητα, συχνά λόγω πραγματικού συναγωνισμού για την ίδια ενεργό περιοχή. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας μπορεί να είναι είτε ένα μη μεταβολιζόμενο ανάλογο ή παράγωγο του υποστρώματος, είτε προϊόν της αντίδρασης.

Ένα κλασικό παράδειγμα συναγωνιστικής αναστολής είναι η δράση του μηλονικού οξέος στην αντίδραση της οξειδωσης του ηλεκτρικού οξέος προς φουμαρικό



Το μηλονικό οξύ μοιάζει σημαντικά με το ηλεκτρικό ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρ'όλα αυτά επειδή διαθέτει μόνο μια μεθυλενομάδα δεν μπορεί να γίνει η οξειδοαναγωγή.

Στο σχήμα 25 απεικονίζονται μερικές από τις γνωστότερες περιπτώσεις συναγωνιστικής αναστολής<sup>27</sup>.

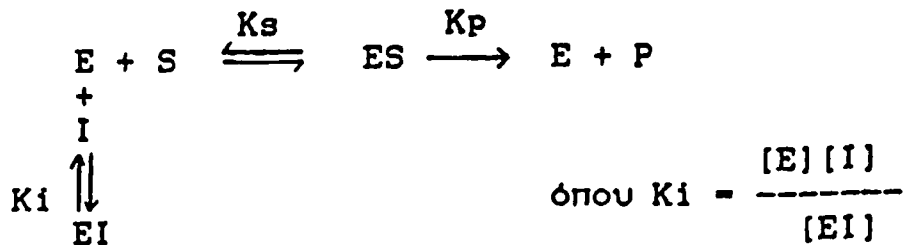


**Σχήμα 25.** Βασικά μοντέλα συναγωνιστικής αναστολής.

1. Κλασσική περίπτωση συναγωνιστικής αναστολής. Ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υποστρώμα για το ίδιο σημείο σύνδεσης.
2. Στεροχημική παρεμπόδιση του υποστρώματος από τον αναστολέα
3. Στεροχημική παρεμπόδιση ή συναγωνισμός για ένα κοινό σημείο σύνδεσης.
4. Αλληλοεπικάλυψη σημείων σύνδεσης.
5. Η σύνδεση του αναστολέα με ένα ξεχωριστό σημείο σύνδεσης προκαλεί μεταβολή στη διαμόρφωση του ενζύμου Ε και παραμορφώνει ή καλύπτει το σημείο σύνδεσης του υποστρώματος και αντίστροφα.

Το σχήμα των αντιδράσεων που περιγράφει την συναγωνιστική αναστολή έχει ως εξής:





και δεχόμαστε οτι:

- α) Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] της σταθερής κατάστασης.
- β) Για κάθε συγκέντρωση αναστολέα (μακριά από την κατάσταση κορεσμού) η ταχύτητα  $U_i$  (ταχύτητα παρουσία του I) μπορεί να γίνει ίση με  $U$  (ταχύτητα απουσία αναστολέα) αλλά απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση [S] ώστε να ληφθεί η ίδια συγκέντρωση [ES].
- γ) Παρουσία μιας πολύ μεγάλης συγκέντρωσης υποστρώματος [S], (κορεσμός), όλο το E γίνεται [ES], κατά συνέπεια το  $V_{max}$  παρουσία ή απουσία αναστολέα είναι το ίδιο.
- δ) Το φαινομενικό (apparent)  $K_m$  θα αυξηθεί παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα, διότι για κάθε [I] ένα τμήμα του E θα βρίσκεται υπό τη μορφή EI, που δεν έχει χημική συγγένεια με το S.

Η τελική εξίσωση που περιγράφει τη συναγωνιστική αναστολή λαμβάνοντας υπ' όψη όλες τις προηγούμενες παραδοχές είναι της μορφής:

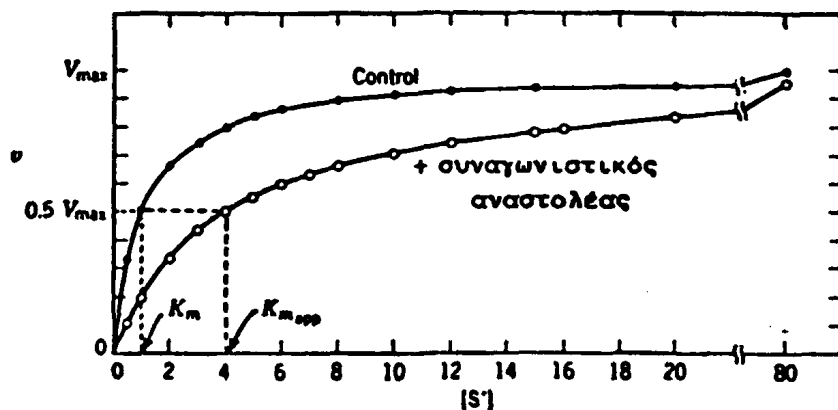
$$\frac{U}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3) \quad \eta$$

$$\frac{1}{U} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

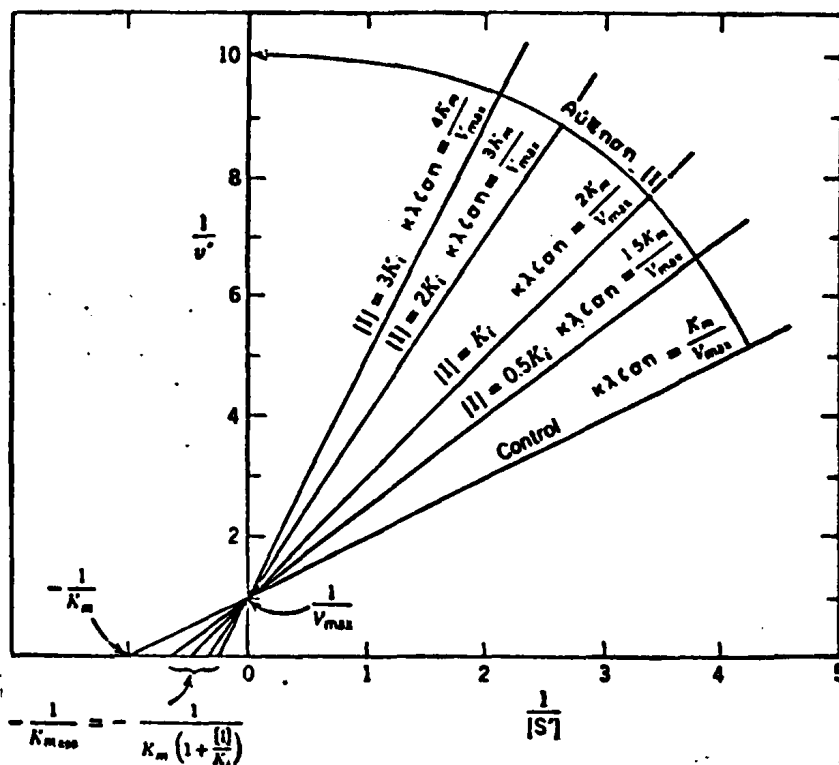
και απεικονίζονται στα σχήματα 26 και 27.

5





**Σχήμα 26.** Διάγραμμα μεταβολής της ταχύτητας  $v$  μιας ενδυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , απουσία και παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης συναγωνιστικού αναστολέα.



**Σχήμα 27.** Διάγραμμα Lineweaver-Burk μιας ενδυμικής αντίδρασης χωρίς αναστολέα και παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα.



Απο τη γραφική παράσταση του σχήματος 27 παρατηρείται ότι: Το σημείο τομής του άξονα  $1/U$  παραμένει ίδιο ( $1/V_{max}$ ) με ή χωρίς αναστολέα, ενώ η κλίση της ευθείας αυξάνει κατά ένα παράγοντα  $(1+([I]/K_i))$ . Η σταθερά Michaelis-Menten  $K_m$  πολλαπλασιάζεται επί τον παράγοντα  $1+([I]/K_i)$  και λέγεται  $K_{mapp}$ , δηλ.

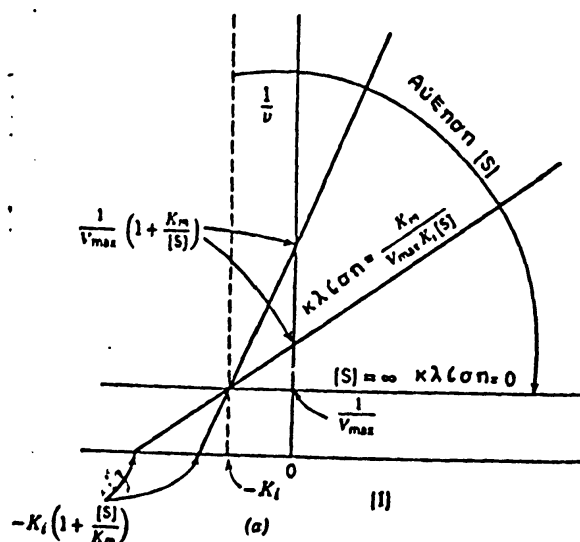
$$-\frac{1}{K_{mapp}} = -\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Για κάθε συγκέντρωση αναστολέα αντιστοιχεί καινούργια γραφική παράσταση. Αυξανόμενου του  $[I]$  αυξάνει και η κλίση της ευθείας, ενώ το  $1/V_{max}$  παραμένει σταθερό. Επίσης το σημείο τομής πάνω στον άξονα του  $1/[S]$  μικραίνει, ενώ το  $K_{mapp}$  αυξάνει.

Μια άλλη μέθοδος γραφικού προσδιορισμού των  $V_{max}$  και  $K_i$  είναι το διάγραμμα κατά DIXON<sup>29</sup>, το οποίο είναι γραφική αναπαράσταση της εξίσωσης:

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

Το διάγραμμα  $1/U$  προς  $[I]$  είναι ευθεία γραμμή με κλίση  $\frac{K_m}{V_{max} K_i [S]}$



Σχήμα 28. Διάγραμμα Dixon μιας συναγωνιστικής αναστολής.



Οι γενικές αρχές της συναγωνιστικής αναστολής συνοψίζονται ως εξής:

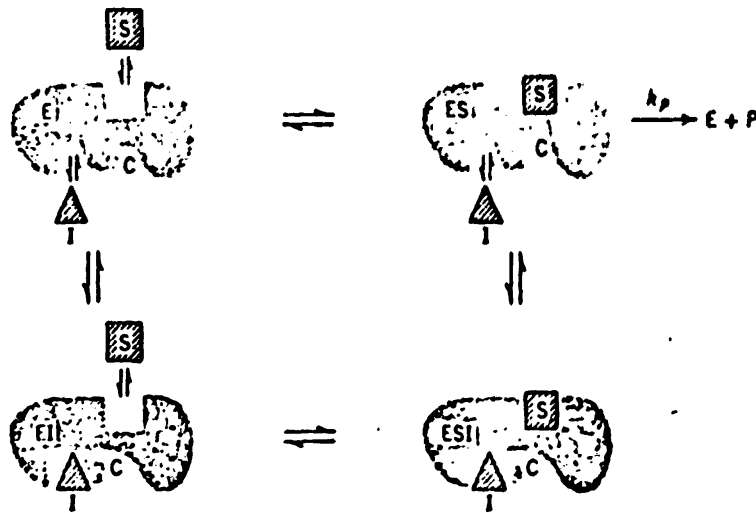
1. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας προκαλεί αύξηση του  $K_m$  σε  $K_{m,app}$  για το υπόστρωμα.
2. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα  $[I]$  αυξάνει τότε και η σταθερά  $K_{m,app}$  αυξάνει.
3. Το  $V_{max}$  παραμένει αμετάβλητο, αλλά παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα απαιτείται μια πολύ μεγαλύτερη  $[S]$  για να επιτευχθεί το ίδιο  $V_{max}$ .
4. Ο βαθμός αναστολής που προκαλείται από ένα συναγωνιστικό αναστολέα εξαρτάται από το  $[S]$ ,  $[I]$ ,  $K_m$  και  $K_i$ .
5. Αύξηση του  $[S]$  με σταθερό  $[I]$  μειώνει το βαθμό αναστολής.
6. Αύξηση του  $[I]$  με σταθερό  $[S]$  αυξάνει το βαθμό αναστολής.
7. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του  $K_i$  τόσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός αναστολής για δεδομένα  $[S]$  και  $[I]$ .
8. Το  $K_i$  είναι ισοδύναμο με εκείνη τη συγκέντρωση αναστολέα που διπλασιάζει την κλίση της γραφικής παράστασης:

$$\frac{1}{U} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$$

### VI.2. Μη συναγωνιστική αναστολή (Non competitive Inhibition)

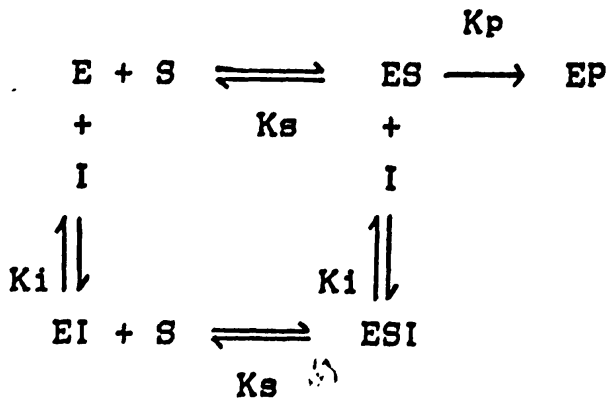
Μια κλασική μη συναγωνιστική αναστολή δεν έχει επίδραση πάνω στο σημείο σύνδεσης του υποστρώματος και αντίστροφα. Το υπόστρωμα  $S$  και ο αναστολέας  $I$  συνδέονται αντιστρέφτα, τυχαία και ανεξάρτητα σε διαφορετικά σημεία. Αυτό σημαίνει ότι ο αναστολέας  $I$  συνδέεται με το ένζυμο  $E$  και το σύμπλοκο  $ES$ , ενώ το υπόστρωμα  $S$  συνδέεται με το ένζυμο  $E$  και το σύμπλοκο  $EI$ . Παρ'όλα αυτά το προκύπτον σύμπλοκο  $ESI$  είναι καταλυτικά αδρανές.





**Σχήμα 29.** Μη συναγωνιστική αναστολή. Το υπόστρωμα S και ο αναστολέας I δεν παρουσιάζουν αμοιβαία αποκλειστικότητα αλλά το ESI είναι καταλυτικά αδρανές. Η δέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του προσανατολίζοντας κατάλληλα το καταλυτικό κέντρο C ως προς τους δεσμούς του υποστρώματος S. Ο αναστολέας I παρεμβαίνει στην αλλαγή της διαμόρφωσης αλλά δεν επιδρά πάνω στο σημείο σύνδεσης του υποστρώματος.

Το σχήμα αντιδράσεων σ'αυτή την περίπτωση είναι το εξής:



Επιπλέον ισχύουν οι ισορροπίες:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}, \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$



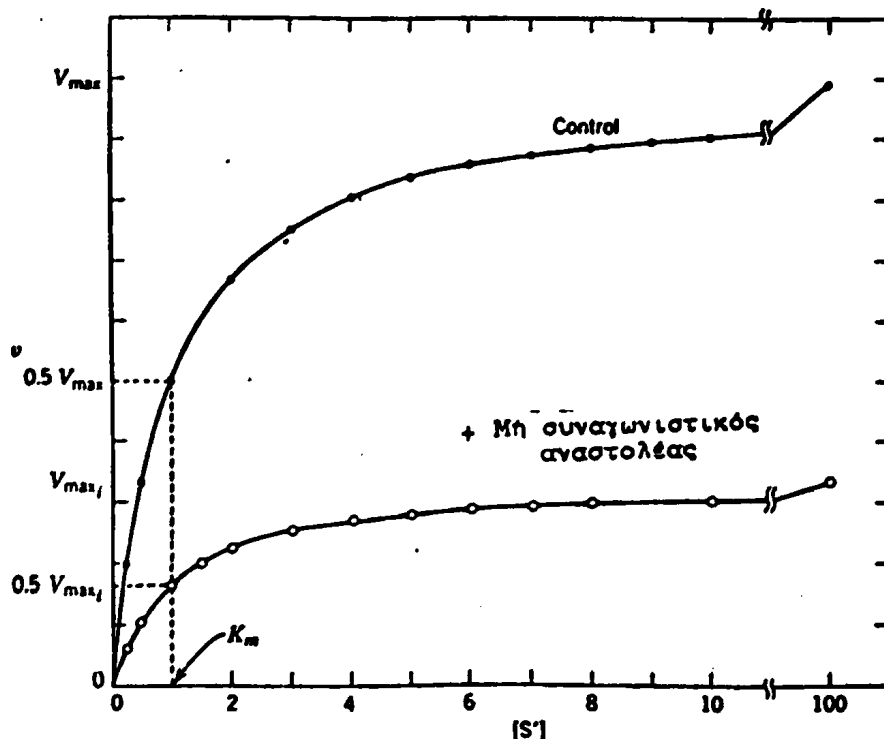
Απο τις παραπάνω ισορροπίες φαίνεται ότι για κάθε [I] μια απροσδιόριστα μεγάλη [S] δεν μπορεί να μετατρέψει το ένζυμο στη παραγωγική ES μορφή. Κατά συνέπεια το  $V_{max}$ , (παρουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα) θα είναι μικρότερο από το  $V_{max}$  απουσία αναστολέα. Η τιμή της σταθεράς  $K_m$  θα είναι αμετάβλητη παρουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα, διότι για κάθε [I] οι μορφές του ενζύμου E (δηλ. E και EI) που μπορούν να ενωθούν με το υπόστρωμα S έχουν ίση χημική συγγένεια ως προς το S.

Η εξίσωση που περιγράφει μια μη συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής:

$$\frac{U}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (5) \quad \eta$$

$$\frac{1}{U} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (6)$$

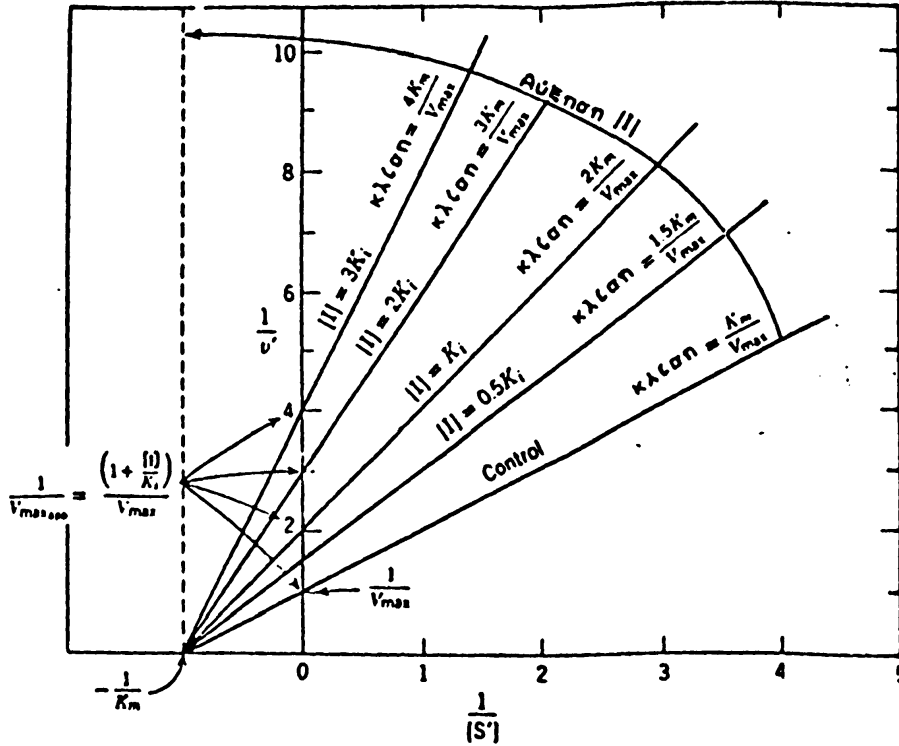
Οι γραφικές παραστάσεις των εξισώσεων (5), (6) φαίνονται στα σχήματα 30, 31 αντίστοιχα.



**Σχήμα 30.** Διάγραμμα μεταβολής της ταχύτητας U μιας ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S], απουσία και παρουσία ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.







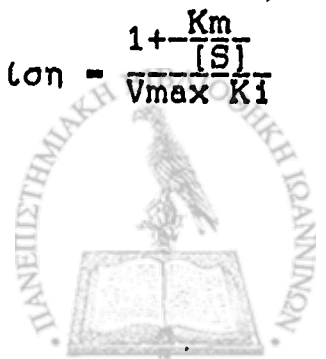
**Σχήμα 31.** Διάγραμμα Lineweaver-Burk μιας ενζυμικής αντίδρασης χωρίς αναστολέα και παρουσία ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.

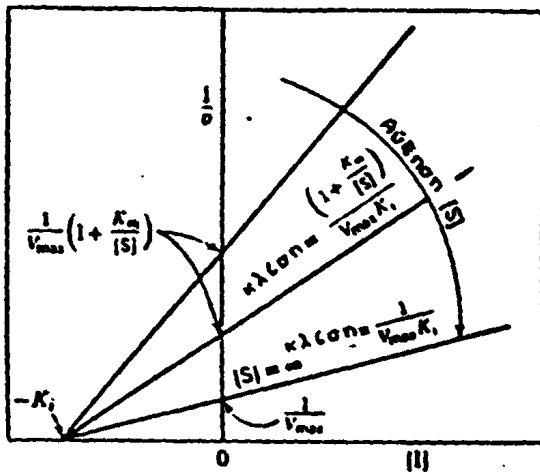
Από την εξίσωση (6) και την αντίστοιχη γραφική παράσταση, φαίνεται ότι τόσο η κλίση όσο και το σημείο τομής του άξονα των  $1/U$  έχουν αυξηθεί κατά τον παράγοντα  $1+(1/K_i)$  σε σχέση με την καμπύλη που αντιστοιχεί απουσία αναστολέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σταθερά  $K_m$  να μένει σταθερή ενώ το  $V_{max}$  να μειώνεται.

Η γραφική παράσταση κατά DIXON της μη συναγωνιστικής αναστολής δίνεται στο σχήμα 32. Η εξίσωση που περιγράφει το διάγραμμα αυτό είναι της μορφής:

$$-\frac{1}{U} = \frac{(1 + \frac{K_m}{[S]})}{V_{max} K_i} [I] + \frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{K_m}{[S]})$$

και η κλίση της καμπύλης δίνεται από τη σχέση: κλίση =  $\frac{1 + \frac{K_m}{[S]}}{V_{max} K_i}$

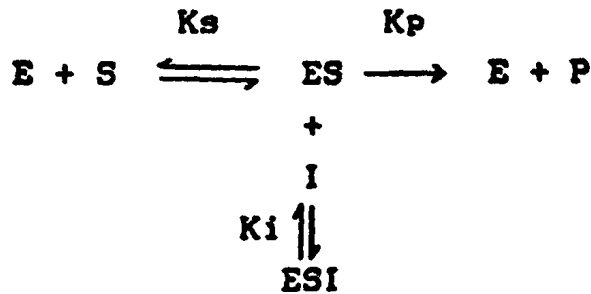




Σχήμα 32. Διάγραμμα Dixon μιας μη συναγωνιστικής αναστολής.

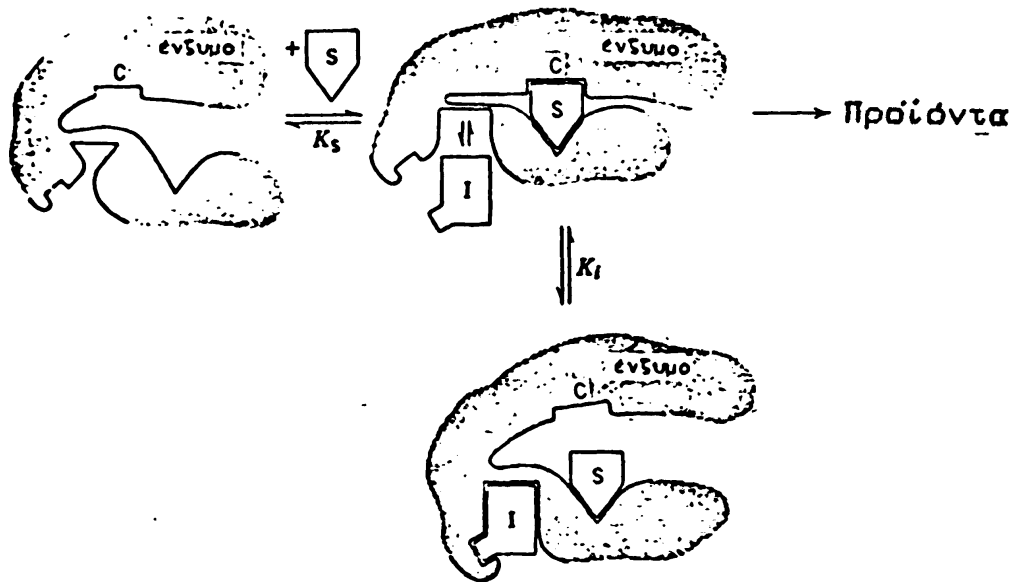
VI.3. Ανταγωνιστική αναστολή (Uncompetitive Inhibition)

Στις προηγούμενες περιπτώσεις οι αναστολεις μπορούν και δεσμεύονται απ' ευθείας με το ένζυμο. Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES. Το σχήμα αντιδράσεων για ένα τέτοιο σύστημα είναι το εξής:



Από τις παραπάνω ισορροπίες φαίνεται ότι για οποιαδήποτε συγκέντρωση αναστολέα [I], μια εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος δεν θα μπορέσει να οδηγήσει όλο το ένζυμο στη μορφή ES, αλλά θα υπάρχει πάντα ένα μέρος μη αποδοτικού ESI. Επομένως μπορούμε να προβλέψουμε ότι  $V_{max} > V_{max_i}$  και ότι το  $K_{m_{pp}} < K_m$ .





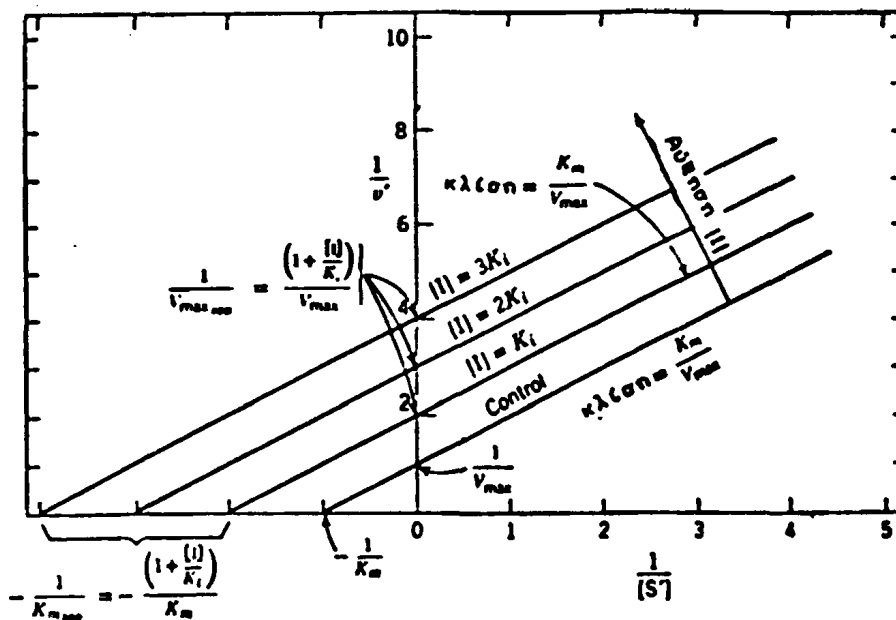
**Σχήμα 33.** Ανταγωνιστική αναστολή. Ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο από το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES. Όταν το υπόστρωμα δεσμεύεται, επέρχεται αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου η οποία ευνοεί τη σύνδεσή του με τον αναστολέα. Το σύμπλοκο ESI είναι καταλυτικά αδρανές. C: παριστάνει το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Η εξίσωση που περιγράφει την ανταγωνιστική αναστολή είναι της μορφής:

$$-\frac{1}{U} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (7)$$

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης αυτής δίνεται στο σχήμα 34, απ' όπου παρατηρείται ότι η κλίση της καμπύλης παραμένει η ίδια με ή χωρίς αναστολέα με μια μόνο παράλληλη μετατόπιση ως προς τον άξονα αναφοράς (χωρίς αναστολέα). Το σημείο τομής στον άξονα του  $1/U$  είναι αυξημένο κατά  $1 + ([I]/K_i)$ .

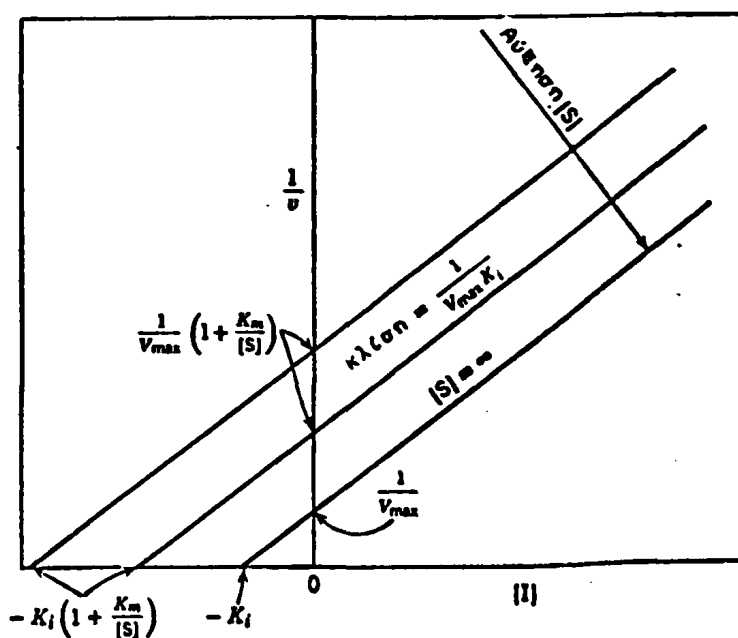




**Σχήμα 34.** Διάγραμμα Lineweaver-Burk μιας ενζυμικής αντίδρασης χωρίς αναστολέα και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ενός ανταγωνιστικού αναστολέα.

Η γραφική παράσταση κατά Dixon της ανταγωνιστικής αναστολής δίνεται στο σχ.35 και η εξίσωση που περιγράφει το διάγραμμα είναι της μορφής:

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



**Σχήμα 35.** Διάγραμμα Dixon μιας ανταγωνιστικής αναστολής.

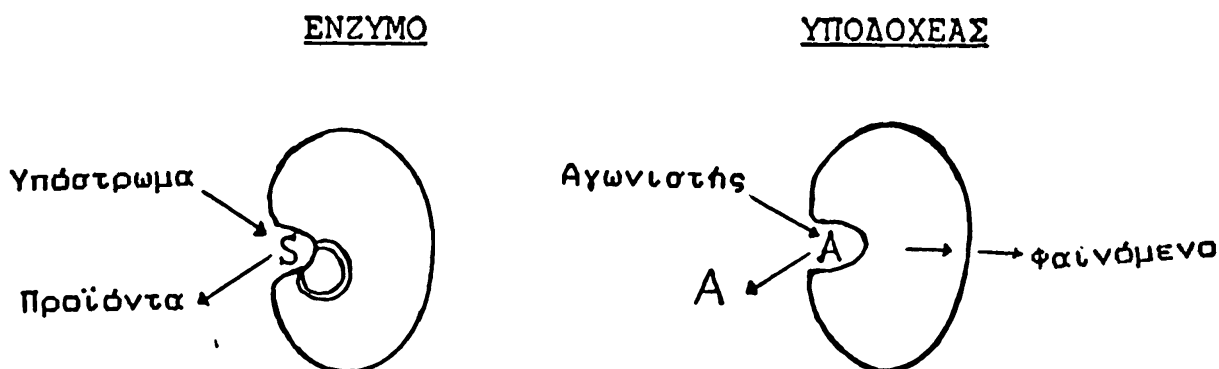


#### VI. 4. Σχεδιασμός Αναστολέων

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ένας αναστολέας μπορεί να παίξει βασικό ρόλο σε μια ενζυμική αντίδραση ή σε ένα σύστημα ενζυμικών αντιδράσεων. Φυσικοί όσο και συνθετικοί αναστολείς βρήκαν μια τεράστια εφαρμογή στην Κλινική θεραπευτική.

Μερικά από τα ερωτήματα που απασχόλησαν και συνεχίζουν να απασχολούν του ερευνητές είναι: πώς δημιουργήθηκαν οι συνθετικοί αναστολείς; τυχαία συντέθηκαν ενώσεις και στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι δρουν σαν αναστολείς κάποιου ενζύμου; η δομή των αναστολέων παρουσιάζει κάποια ομοιότητα με τη δομή του ενζύμου ή του υποστρώματος του; Απάντηση στα παραπάνω έδωσε μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη των Cushman και Ondetti<sup>27</sup>, η οποία κατόρθωσε να συνοψίσει τις γενικές αρχές πάνω στη φιλοσοφία του σχεδιασμού ενός αναστολέα. Στηριζόμενοι σε ένα συσχετισμό μεταξύ ενζύμου και υποδοχέα, όπως ακριβώς φαίνεται στο σχήμα 36, έκαναν τις εξής παραδοχές:

- α) Ο αγωνιστής ισοδυναμεί με υπόστρωμα
- β) Ο ανταγωνιστής ισοδυναμεί με αναστολέα



Σχήμα 36. Η αναλογία ενζύμου-υποδοχέα.

Ενα ένζυμο έχει πολλά από τα γνωρίσματα του υποδοχέα. Ο αγωνιστής ή το υπόστρωμα δεσμεύεται στο μακρομόριο και αυτή ακριβώς η δέσμευση ακολουθείται από κάποιο "φαινόμενο". Στη περίπτωση του ενζύμου, αυτό το φαινόμενο δεν κατευθύνεται προς ή δια μέσου μιας άλλης δομής μακρομορίου, αλλά κατευθύνεται



απ' ευθείας προς αυτό το ίδιο το υπόστρωμα (αγωνιστής), οδηγώντας το έτσι σε μια αλλαγή της αρχικής του δομής, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των προϊόντων. Σε αυτή τη συσχέτιση μεταξύ υποδοχέα και ενζύμου όπως αναφέρθηκε μέχρι εδώ, το πρόβλημα του σχεδιασμού των αναστολέων των ενζύμων, έχει πολλά ή πιθανά όλα τα γνωρίσματα που χαρακτηρίζουν το σχεδιασμό των αναλόγων πεπτιδικών ορμονών, με μόνη ίσως ασήμαντη διαφορά ότι στην περίπτωση των ενζύμων ενδιαφερόμαστε για τους ανταγωνιστές π.χ. αναστολείς. Με βάση όλα τα παραπάνω ο σχεδιασμός ενός αναστολέα μπορεί να στηριχθεί:

- 1ον) Στην πρωτοταγή δομή των υποστρωμάτων
- 2ον) Στο μηχανισμό δράσης του ενζύμου

#### 1ον. Σχεδιασμός αναστολέων βασιζόμενος στη πρωτοταγή δομή των υποστρωμάτων.

Ο Rudinger<sup>42</sup> το 1970 διαπίστωσε ότι ο σχεδιασμός αναλόγων πεπτιδικών ορμονών στηρίζεται σε δύο βασικούς τύπους τροποποίησης της δομής τους.

- α) τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων
- β) τροποποίηση του πεπτιδικού σκελετού.

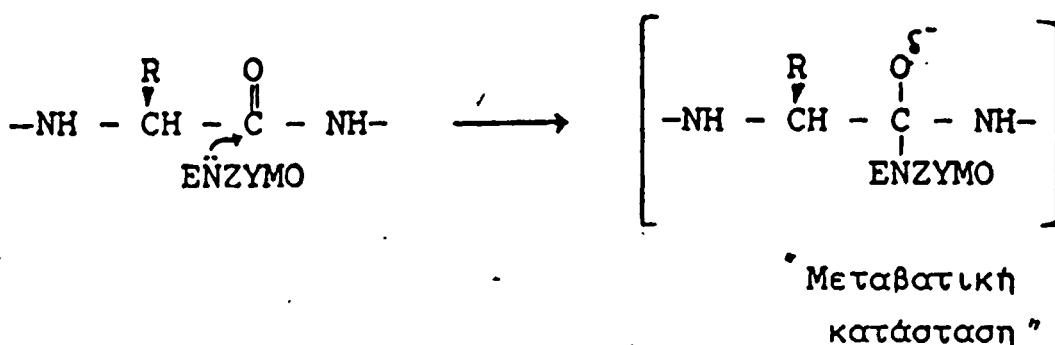
Ακολουθώντας αυτή ακριβώς τη λογική οι Ondetti και Cushman<sup>44</sup> καθώς και άλλοι ερευνητές<sup>42-43</sup> συνέθεσαν μια σειρά από ισχυρούς αναστολείς ενζύμων, όπως π.χ. του angiotensin-converting enzyme (A.C.E.) κ.α.

#### 2ον. Σχεδιασμός αναστολέων βασιζόμενος στο μηχανισμό δράσης του ενζύμου.

Ενώ για το σχεδιασμό των πεπτιδικών αναλόγων ορμονών σημείο εκκίνησης είναι μόνο η πρωτοταγής δομή του αρχικού πεπτιδίου, καθ' ότι πολύ λίγα είναι γνωστά γύρω από τη δομή και το μηχανισμό δράσης του υποδοχέα, στην περίπτωση των ενζύμων ο σχεδιασμός των αναστολέων είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματικός όταν βασίζεται, τόσο στη μελέτη της δομής όσο και στη μελέτη του μηχανισμού δράσης του ενζύμου.



Προς την κατεύθυνση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου έχουν γίνει πολλές μελέτες με αποτέλεσμα να έχουν βρεθεί ισχυροί αναστολείς πολλών ενζύμων, ιδιαίτερα των πρωτεασών. Ενδεικτικά παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι η πεψατίνη<sup>44</sup> ισχυρός αναστολέας της πεψίνης καθώς και μια σειρά πεπτιδία αναστολείς του A.C.E.<sup>45</sup>. Για να σχεδιασθούν οι προαναφερθέντες αναστολείς, έγινε η παραδοχή της ύπαρξης μιας μεταβατικής κατάστασης που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση ενζύμου - υποστρώματος όπως απεικονίζεται στο σχήμα 37. Οι αναστολείς αυτού του τύπου ονομάζονται "αναστολείς ανάλογοι μεταβατικής κατάστασης".



Σχήμα 37. Σχηματική παράσταση της μεταβατικής κατάστασης που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση ενζύμου -υποστρώματος.

Τέλος πρέπει να επισημάνουμε ότι η όλη προαναφερθείσα λογική πάνω στο σχεδιασμό των αναστολέων των ενζύμων, δηλ. από τη μια μεριά ο συσχετισμός ενζύμου-υποδοχέα και από την άλλη ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου, έχει επιφέρει την τελευταία δεκαετία μια σημαντική εξέλιξη στη σύνθεση νέων ισχυρών αναστολέων πολλών ενζύμων.

## VII. Κολλαχενάσες

Οι πρωτεάσες (πρωτεολυτικά ένζυμα), συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η πήξη του αίματος, η θρομβώλυση, η φαγοκύτωση, η πέψη κλπ. και εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς τα φυσικά τους υποστρώματα. Οι πεπτιδικοί δεσμοί που διασπώνται από τις πρωτεάσες προκαλούν ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών ή ενζύμων, πρόκειται δε για μη αντιστρεπτή πορεία μια και δεν υπάρχουν βιοχημικές διεργασίες επανασύνθεσης του πεπτιδικού δεσμού. Είναι φανερό ότι η πρωτεόλυση είναι μια ταχεία μη αντιστρεπτή μέθοδος προώθησης ή καταστολής πολλών φυσιολογικών πορειών, στις οποίες οι πρωτεάσες και οι φυσικοί αναστολείς τους λειτουργούν ως ρυθμιστές.

Οι πρωτεάσεις έξω από το φυσιολογικό τους περιβάλλον (κύτταρο) μπορούν να αποδειχθούν εξαιρετικά καταστρεπτικές, εφ' όσον δεν ελέγχονται προσεκτικά ή δεν διαμερισματοποιούνται κατάλληλα. Το δυναμικό μιας μη ελεγχόμενης πρωτεόλυσης μπορεί να αναγνωρισθεί από το γεγονός, ότι περίπου το 10% κατά βάρος των πρωτεϊνών του πλάσματος του αίματος είναι αναστολείς πρωτεασών. Σήμερα πιστεύεται ότι πολλές ασθένειες είναι αποτέλεσμα μιας διαταραχής μεταξύ εξειδικευμένων πρωτεασών και των φυσικών αναστολέων τους<sup>66</sup>.

Στην εργασία αυτή το ενδιαφέρον μας συγκεντρώνεται στις κολλαχενάσες που είναι μικρά σύνολα πρωτεασών (ενδοπεπτιδασών) οι οποίες συμμετέχουν τόσο σε φυσιολογικές πορείες όπως είναι η σύσπαση της μήτρας<sup>67</sup> όσο και σε διάφορες παθολογικές διαδικασίες όπως είναι το έλκος<sup>68</sup>, ρευματοειδής αρθρίτιδα<sup>69</sup>, οι περιοδοντικές παθήσεις<sup>70</sup> και οι μεταστάσεις κακοήθων όγκων<sup>71</sup>.

### VII.1. Απομόνωση - Καθαρισμός - Υπόστρωμα

Οι κολλαχενάσεις με υψηλή εξειδίκευση διασπούν το κολλαγόνο που είναι και το φυσικό τους υπόστρωμα<sup>72</sup>.

Το κολλαγόνο είναι πολύ διαδεδομένο στο ζωικό βασίλειο και ιδιαίτερα στα θηλαστικά αποτελεί το 1/3 όλων των πρωτεϊνών





και το 6% του βάρους του σώματος. Οι ιδιάζουσες ιδιότητες του του επιτρέπουν να δρα σαν το κυρίως πλέγμα στηρίξεως του σώματος. Κάθε μόριο κολλαγόνου έχει μοριακό βάρος περίπου 100.000 και αποτελείται απο τρεις πεπτιδικές αλυσίδες, που διατάσσονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αποτελούν μια τριπλή έλικα<sup>73</sup>. Απο πλευράς πρωτοταγούς δομής το κολλαγόνο χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό ορισμένων αμινοξέων, όπως γλυκίνης που αποτελεί το 33% περίπου όλων των αμινοξέων και προλίνης (υδροξυλιωμένης και μη) που αποτελεί το 21% περίπου του μορίου. Η αλληλουχία των αμινοξέων είναι τέτοια ώστε σε κάθε τρίτη θέση να υπάρχει μια γλυκίνη. Η τριπλή έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της NH-ομάδας μιας γλυκίνης και του C=O της προλίνης ή άλλου αμινοξέος ενός διπλανού κλώνου.

Πολλά ένζυμα που αρχικά θεωρήθηκαν σαν κολλαγενάσες αποδείχθηκε αργότερα ότι ήταν πρωτεάσες ή πεπτιδάσες ευρείας η διαφορετικής δραστηριότητας. Μια αληθινή κολλαγενάση αποικοδομεί τις ελικοειδείς περιοχές του φυσικού κολλαγόνου και κατά προτίμηση το δεσμό X-Gly. Η παρατήρηση ότι ένα ένζυμο αποικοδομεί συνθετικά πεπτιδία που έχουν σειρά αμινοξέων παρόμοια με αυτή του κολλαγόνου, δεν είναι ικανοποιητική απόδειξη ότι πρόκειται για κολλαγενάση.

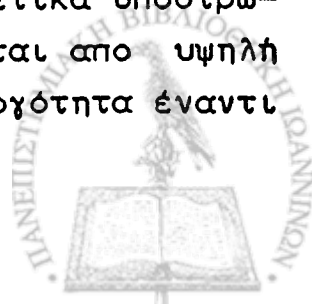
Οι κολλαγενάσες μπορούν να απομονωθούν απο ποικιλία ζωικών ιστών<sup>74-75</sup> και απο κατώτερους οργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες. Οι σημαντικότερες πηγές κολλαγενάσης είναι τα βακτήρια *Clostridium histolyticum*<sup>74</sup> και *Achromobacter Iorhagus*<sup>77</sup>. Το βακτήριο *Achromobacter Iorhagus* παράγει κολλαγενάση όταν καλλιεργηθεί σε αερόβιες συνθήκες και σε ρυθμιστικό διάλυμα 5% πεπτόνης, ενώ το βακτήριο *Clostridium histolyticum* παράγει κολλαγενάση όταν καλλιεργηθεί σε αναερόβιες συνθήκες. Η κολλαγενάση που απομονώνεται απο το *Achromobacter Iorhagus* υπερέχει της κολλαγενάσης που απομονώνεται απο το *Clostridium histolyticum*, διότι αφ'ενος μεν δεν περιέχει τοξίνη και δεν απαιτεί αναερόβιες συνθήκες, αφ'ετέρου δε η ενζυμική δραστηριότητα της πρώτης είναι πολύ υψηλότερη από αυτή της δεύτερης.



Οι κολλαγενάσες των βακτηρίων πιστεύεται ότι διασπούν το κολλαγόνο σε μικρότερα τμήματα εξ' αιτίας της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα σε πολλαπλά σημεία κατά μήκος της τριπλής έλικας<sup>78</sup>. Οι κολλαγενάσες των θηλαστικών από την άλλη πλευρά, αποικοδομούν το κολλαγόνο σε δύο μόνο τμήματα με μοριακά βάρη περίπου 74.000 και 21.000 αντίστοιχα με υδρόλυση σε ένα ορισμένο σημείο που βρίσκεται περίπου στα 3/4 από το N-τελικό<sup>79,80</sup>.

Οι κολλαγενάσες των βακτηρίων αποικοδομούν το δεσμό Y-Gly<sup>81,82</sup> (όπου Y=αλειφατικό αμινοξύ) δηλαδή από την αμινο-άκρη της γλυκίνης, ενώ η κολλαγενάση των θηλαστικών υδρολύει το δεσμό Gly-Y, δηλαδή από το καρβόξυλο-άκρο της γλυκίνης. Η Clostridium κολλαγενάση διασπά ευκολότερα το δεσμό X-Gly όταν η Gly ακολουθείται από μια Pro (X-Gly-Pro), ενώ η Achromobacter κολλαγενάση αποικοδομεί ταχύτερα το δεσμό X-Gly όταν ακολουθείται μια Ala (X-Gly-Ala). Εξαιρέσεις σ' αυτή την εξειδίκευση έχουν αναφερθεί, που όμως οφείλονται στην ετερογένεια των ενζυμικών παρασκευασμάτων<sup>83</sup>.

Εκτεταμένες μελέτες έχουν γίνει από πολλούς ερευνητές<sup>84,85</sup> για την απομόνωση καθαρών κλασμάτων κολλαγενάσης, τα αποτελέσματα των οποίων όμως δεν βρίσκονται σε μια γενική συμφωνία όσον αφορά τον αριθμό των υπάρχοντων ενζύμων και των ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα τα μοριακά βάρη των κολλαγενασών που έχουν αναφερθεί ποικίλουν από 66.000<sup>86</sup> έως 147.000<sup>87</sup> ενώ η ακριβής θέση των αμινοξέων, η σταθερότητα και η ενεργότητα των ενζύμων αυτών διαφέρουν. Μια πρόσφατη και αρκετά αξιόλογη μελέτη είναι αυτή που έγινε από τους Van Wart και Bond<sup>88,89</sup> η οποία αναφέρεται στον καθαρισμό της Clostridium κολλαγενάσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής η Clostridium κολλαγενάση είναι ένα μίγμα έξι κολλαγενασών (α, β, γ, δ, ε και ζ), με μοριακά βάρη από 68.000 έως 125.000. Οι έξι αυτές μορφές κολλαγενάσης χωρίζονται σε δύο τάξεις με βάση την ενεργότητά τους ως προς το κολλαγόνο και τα συνθετικά υποστρώματα. Η τάξη I (α, β, γ κολλαγενάσες) χαρακτηρίζεται από υψηλή ενεργότητα ως προς το κολλαγόνο και μέτρια ενεργότητα έναντι



του FALGPA, ενώ η τάξη II (δ, ε, ζ κολλαγενάσες) χαρακτηρίζεται από μέτρια ενεργότητα έναντι του κολλαγόνου και υψηλή έναντι του FALGPA (συνθετικό υπόστρωμα).

Τα ισοηλεκτρικά σημεία όλων των κολλαγενασών βρίσκονται στην περιοχή 5,30-6,20 και έχει αποδειχθεί ότι το βέλτιστο pH για τις κολλαγενάσες είναι μεταξύ 6-7, με αποτέλεσμα όταν βρεθούν σε ισχυρώς όξινο ή αλκαλικό pH να μεταπίπτουν σε ανενεργές.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κατά καιρούς συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας όσο και για την κινητική μελέτη του ενζύμου. Από αυτά τα περισσότερα εύχρηστα είναι:

- FA-Leu-Gly-Pro-Ala<sup>10</sup> (1)
- FA-Leu-Gly-Pro-Pro, (2)
- Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg<sup>11</sup> (3)
- Cbz-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro<sup>12</sup> (4)
- Cbz-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala<sup>13</sup> (5)

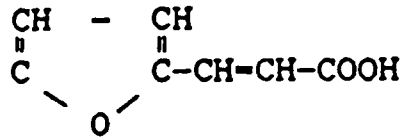
όπου: Cbz: βενζυλοξυκαρβονυλομάδα

Pz: p-φαινυλαξοβενζυλοξυκαρβονυλομάδα

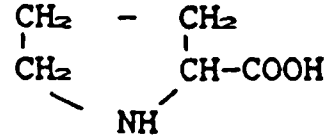
FA: 2-φουρανοκρυλοϋλομάδα

Η παρακολούθηση της ταχύτητας υδρόλυσης των πεπτιδίων (1) και (2) γίνεται με τη βοήθεια μιας συνεχούς φασματοφωτομετρικής μεθόδου κινητικής μελέτης του ενζύμου, λόγω μετατόπισης προς μικρότερο μήκος κύματος της απορρόφησης του FA-Leu όταν ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου αμινοξέος έχει υδρολυθεί. Επίσης στο υπόστρωμα (3), το χρωμοφόρο κλάσμα Pz-Pro-Leu που παράγεται από την υδρόλυση εκχυλίζεται ποσοτικά με οξικό αιθυλεστέρα και η συγκέντρωσή του προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης σε ένα ορισμένο μήκος κύματος. Τέλος στα υποστρώματα (4) και (5) η ταχύτητα υδρόλυσης παρακολουθείται χρωματογραφικά με προσδιορισμό της ελεύθερης αμινομάδας (Gly-Pro και Gly-Pro-Ala αντίστοιχα) μετά από αντίδραση με νινυδρίνη. Από όλα τα μέχρι σήμερα γνωστά συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματα το FA-Leu-Gly-Pro-Ala έχει αποδειχθεί ότι είναι το καλύτερο, λόγω μάλλον της δομικής συγγένειας της 2-φουρανοκρυλοϋλομάδας (FA) με την προλίνη (Pro).





FA



Pro

## VII.2. Οι κολλαγενάσες ως μεταλλοένζυμα

Απο την αλληλεπίδραση των μετάλλων με πρωτεΐνες προκύπτουν, είτε μεταλλοπρωτεΐνες στις οποίες το μέταλλο συνδέεται τόσο σταθερά με το πρωτεϊνικό μόριο ώστε να μην απομακρύνεται κατά την διάρκεια της απομόνωσής του, είτε σύμπλοκα μετάλλου-πρωτεΐνης στα οποία το μέταλλο συνδέεται πιο χαλαρά, με αποτέλεσμα η προσφορά του στην πρωτεΐνη να είναι χημικά και βιολογικά λιγώτερο σημαντική.

Ο ρόλος του Zn στα μεταλλο-ένζυμα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις κατηγορίες: καταλυτικό, δομικό, ρυθμιστικό και μη καταλυτικό<sup>74</sup>.

α) Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταλλοενζύμων στα οποία ο Zn παίζει καταλυτικό ρόλο είναι η καρβοξυπεπτιδάση, η θερμολυσίνη και οι κολλαγενάσες. Με αφαίρεση του Zn λαμβάνουμε το ανενεργό αποένζυμο το οποίο ωστόσο διατηρεί τη δομή του.

β) Στη περίπτωση της ασαρτικής τρανσκαρβαμυλάσης ο Zn συνεισφέρει αποκλειστικά στη σταθεροποίηση της τεταρτοταχούς δομής του.

γ) Σε μερικές περιπτώσεις ο Zn παίζει ρόλο ρυθμιστικό, αλλά δεν είναι άμεσα υπεύθυνος, ούτε για την ενζυμική δραστηριότητα η οποία υπάρχει και απουσία αυτού, ούτε για την σταθεροποίηση της δομής του. Ο ρυθμιστικός Zn μπορεί να δρα είτε ως ενεργοποιητής είτε ως αναστολέας.

δ) Τμήμα του Zn σε ορισμένα μεταλλοένζυμα, όπως στην ανθρώπινη αλκοολική αφυδρογονάση, στην E.Coli αλκαλική φωσφατάση, αφ' ενός μεν δεν συμμετέχει άμεσα στην κατάλυση, αφ' ετέρου δε δεν είναι απαραίτητος για την διατήρηση της τριτοταχούς δομής του



ενζύμου. Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο ρόλος του Zn είναι ακόμη άγνωστος και συνήθως αναφέρεται ως μη καταλυτικός.

Μελέτες ανταλλαγής μετάλλων έχουν δείξει ότι η αντικατάσταση καταλυτικού ή ρυθμιστικού Zn από άλλα μεταλλοϊόντα επηρεάζει ισχυρά την δραστικότητα του ενζύμου, ενώ αντίθετα η αντικατάσταση του δομικού ή μη καταλυτικού Zn δεν έχει σημαντικές επιπτώσεις. Επιπλέον η γεωμετρία σύμπλεξης και η συμμετρία του καταλυτικού Zn διαφέρει σημαντικά από τις αντίστοιχες των ατόμων Zn που έχουν δομικό ή μη καταλυτικό ρόλο. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι ο καταλυτικός Zn ενώνεται με τρεις πρωτεϊνικής φύσης υποκαταστάτες και ένα μόριο νερού, ενώ ο Zn που χαρακτηρίζεται ως δομικός ή μη καταλυτικός ενώνεται με τέσσερις πρωτεϊνικής φύσης υποκαταστάτες. Η παρουσία ενός μορίου νερού στον καταλυτικό Zn, προσφέρει μια ελεύθερη θέση υποκατάστασης που πιθανόν να είναι απαραίτητη για την καταλυτική δράση του Zn.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι κολλαγενάσες ανήκουν στα μεταλλοένζυμα ψευδαργύρου του οποίου ο ρόλος είναι κύρια καταλυτικός. Η άποψη αυτή τεκμηριώνεται επιπλέον από τα εξής:

1. Η δράση όλων των κολλαγενασών αναστέλλεται από την 1-10 φαινανθρολίνη, EDTA και άλλα χημικά αντιδραστήρια που δεσμεύουν τον  $Zn^{2+}$ .
2. Προσθήκη  $Zn^{++}$  σε ανενεργό κολλαγενάση, λόγω κατεργασίας με την 1-10 φαινανθρολίνη, επαναφέρει την δραστικότητα του ενζύμου<sup>64</sup>.
3. Όταν το βακτήριο *Clostridium histolyticum* καλλιεργηθεί παρουσία  $^{65}Zn$  οι μετέπειτα παραγόμενες κολλαγενάσες περιέχουν  $^{65}Zn^{2+}$ .

Αναλύσεις μετάλλων που πραγματοποιήθηκαν στην *Clostridium* κολλαγενάση πριν τον καθαρισμό της, έδειξαν ότι περιέχει μια σειρά από διοθενή μέταλλα<sup>65</sup> (Πίνακας 2), ενώ μετά από διαδοχικά στάδια καθαρισμού, η ανάλυση μετάλλων που έγινε στην καθαρή πλέον κολλαγενάση έδωσε μόνο ιόντα  $Ca^{++}$  και  $Zn^{++}$ .



Πίνακας 2. Ανάλυση μετάλλων σε μή καθαρή κολλαγενάση.

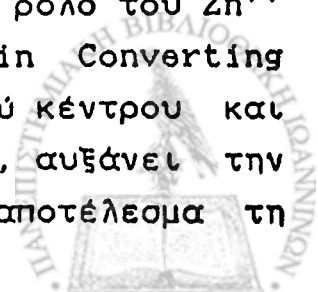
$M^{2+}$	$\mu\text{mol } M^{2+}/\text{gr πρωτεΐνης}$
$\text{Ca}^{2+}$	25
$\text{Cd}^{2+}$	0.063
$\text{Ce}^{2+}$	0.20
$\text{Cu}^{2+}$	1.3
$\text{Fe}^{2+}$	17
$\text{Mg}^{2+}$	24
$\text{Mn}^{2+}$	0.23
$\text{Ni}^{2+}$	0.64
$\text{Zn}^{2+}$	1.0

Όλα τα είδη των κολλαγενάσεων περιέχουν 1 mole  $\text{Zn}^{2+}/\text{mole πρωτεΐνης}$  και μεταβλητές ποσότητες  $\text{Ca}^{2+}$ , των οποίων η τιμή κυμαίνεται από 2 moles/mole πρωτεΐνης για την περίπτωση της α-κολλαγενάσης έως 7 moles/mole πρωτεΐνης για τη β' κολλαγενάση. Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  βοηθούν στη δραστηριότητα των κολλαγενάσεων συμβάλλοντας ίσως στην τεταρτοταγή δομή αυτών.

Επειδή οι κολλαγενάσεις είναι ένζυμα που δεν έχουν μελετηθεί ακόμη διεξοδικά, η μεταφορά όλων των πληροφοριών από άλλα γνωστότερα μεταλλοένζυμα στις κολλαγενάσεις πρέπει να θεωρηθεί ένα σωστό πρώτο βήμα που θα επιτρέψει, αφ' ενός μεν να κατανοηθεί ο μηχανισμός κατάλυσης, αφ' ετέρου δε να συνθεθούν ισχυρότεροι αναστολείς του ενζύμου.

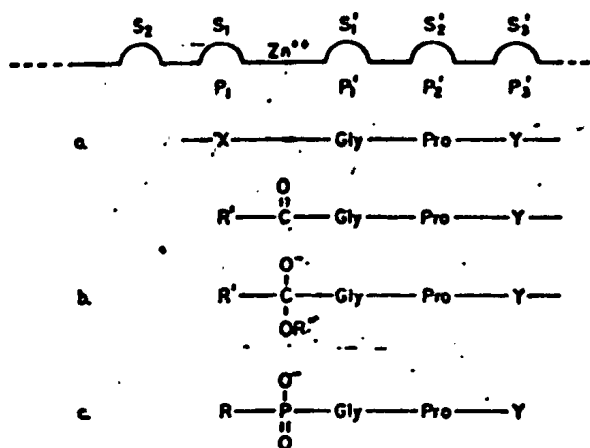
### VII.3. Πρόσφατα αποτελέσματα αναστολέων κολλαγενάσης

Η μελέτη των κολλαγενάσεων και η σύνθεση αναστολέων τους μέχρι στιγμής έχουν γίνει με την προϋπόθεση ότι ο ρόλος του  $\text{Zn}^{2+}$  στις κολλαγενάσεις είναι ίδιος ακριβώς με το ρόλο του  $\text{Zn}^{2+}$  σε άλλα μεταλλοένζυμα όπως π.χ. το Angiotensin Converting Enzyme (A.C.E.). Η αλληλεπίδραση  $\text{Zn}^{2+}$  του ενεργού κέντρου και καρβονυλλίου του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού, αυξάνει την ηλεκτρονοφιλία του άνθρακα του καρβονυλλίου με αποτέλεσμα τη



διευκόλυνση πυρηνόφιλης προσβολής. Πεπτιδία που προέρχονται από αντικατάσταση του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού από την ομάδα  $-PONH-$ , που περιέχει ένα τετραεδρικό φώσφορο όμοιο με τον τετραεδρικό άνθρακα της μεταβατικής κατάστασης είναι ισχυροί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών όπως του  $ACE^{70-77}$ , της θερμολυσίνης και της καρβοξυπεπτιδάσης<sup>100</sup>, της εγκεφαλινάσης<sup>101</sup>.

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της *Clostridium* κολλαγενάσης όπως ακριβώς προτάθηκε από τους Galardy και Grobelny<sup>102</sup>.



Ως  $S_1, S_2$  κλπ. αναφέρονται τα σημεία σύνδεσης του ενζύμου με τα  $P_1, P_2$  αμινοξέα προς τα αριστερά του υπο υδρόλυση δεσμού, ενώ ως  $S_1', S_2'$  τα σημεία σύνδεσης με τα  $P_1', P_2'$  κλπ. προς τα δεξιά του ίδιου δεσμού σύμφωνα με την ονοματολογία που προτάθηκε από τους Schechler και Berger για την παπάληνη. Επίσης

- a: υπόστρωμα κολλαγενάσης
- b: τετραεδρικό ενδιάμεσο μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης όπου  $R''=H$  ή πλευρική αλυσίδα κάποιου αμινοξέος της κολλαγενάσης.
- c: αναστολείς με τετραεδρικό φώσφορο όπου R είναι υδροξύλιο, αίθυλο-, ή ισοάμυλο ομάδα.

Από τους Galardy και Grobelny<sup>102</sup> μελετήθηκαν μια σειρά αναστολέων της *Clostridium* κολλαγενάσης όπου έχει αντικατασταθεί ο υπό υδρόλυση πεπτιδικός δεσμός από άλλες ομάδες όπως  $-PO_2, EtPO_2$  κλπ. (Πίνακας 3).



Πίνακας 3. Αναστολή της Clostridium κολλαγενάσης από ανάλογα πεπτίδια του κολλαγόνου.

Αναστολείς	$I_{50}$ (μM)
I. Gly-Pro	>20.000
II. Gly-Pro-Ala	>10.000
III. Leu-Gly-Pro-Ala	>20.000
IV. PO <sub>3</sub> -Ala	>10.000
V. PO <sub>3</sub> -Gly-Pro	4600±1000
VI. PO <sub>3</sub> -Gly-Pro-Ala	780±170
VII. Et-PO <sub>2</sub> -Gly-Pro-Ala	46±9
VIII. Isoamyl-PO <sub>2</sub> -Gly-Pro-Ala	16±1
IX. n-decyl-PO <sub>2</sub> -Gly-Pro-Ala	14±6

Παρατηρούμε ότι τα N<sup>α</sup>- φωσφορύλο και N<sup>α</sup>-φωσφονύλο-πεπτίδια που περιέχουν Gly-Pro-Ala αν και είναι αρκετά ισχυροί αναστολείς της κολλαγενάσης, ωστόσο είναι 1000 φορές ασθενέστεροι συγκρινόμενοι με τα φωσφορύλο-πεπτίδια αναστολείς άλλων μεταλλοπρωτεασών όπως θερμολυσίνη, A.C.E που είναι γνωστά από άλλες μελέτες.

Μια άλλη αξιολογή προσπάθεια σύνθεσης αναστολέων της κολλαγενάσης έγινε από τον Powers και τους συνεργάτες του<sup>103</sup>. Με βάση τις τιμές των K<sub>i</sub> (πίνακας 4) που προσδιόρισαν διαπιστώθηκε ότι πεπτίδια που περιέχουν σουλφυδρυλομάδα είναι μέτρια καλοί αναστολείς της Clostridium κολλαγενάσης, μολονότι σουλφυδρυλοπεπτίδια είναι ισχυροί αναστολείς της καρβοξυπεπτιδάσης, ελαστάσης, A.C.E. Επίσης καρβοξυλομεθυλοπεπτίδια ενώ είναι ισχυροί αναστολείς του A.C.E., είναι αντίθετα φτωχοί αναστολείς της κολλαγενάσης.

Επίσης μια άλλη αξιολογή εργασία είναι αυτή που έγινε από τους Γιωτάκη et al<sup>104</sup>, οι οποίοι συνέθεσαν μια σειρά μερκα-



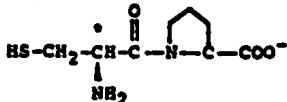
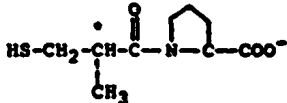
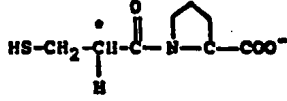


**Πίνακας 4.** Τιμές σταθερών αναστολής  $K_i$  (mM) αντιστρεπτών αναστολέων της *Clostridium* κολλαγενάσης.

Αναστολείς	$K_i$ (mM)
I. HOCH <sub>2</sub> CO-Pro-NH <sub>2</sub>	15
II. Z-Gly-Pro-Leu-OH	4,3
III. Z-Gly-Leu-NHOH	1,5
IV. Z-Gly-Gly-Leu-NHOH	18,9
V. Z-Gly-Pro-Leu-NHOH	0,24
VI. HONHCOCH <sub>2</sub> CO-Pro-NH <sub>2</sub>	4,6
VII. Boc-Gly-Pro-OBzl	0,8
VIII. Boc-Gly-Pro-NHBzl	2,2
IX. HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-Pro-NH <sub>2</sub>	0,25
X. HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-Pro-NHBzl	0,17

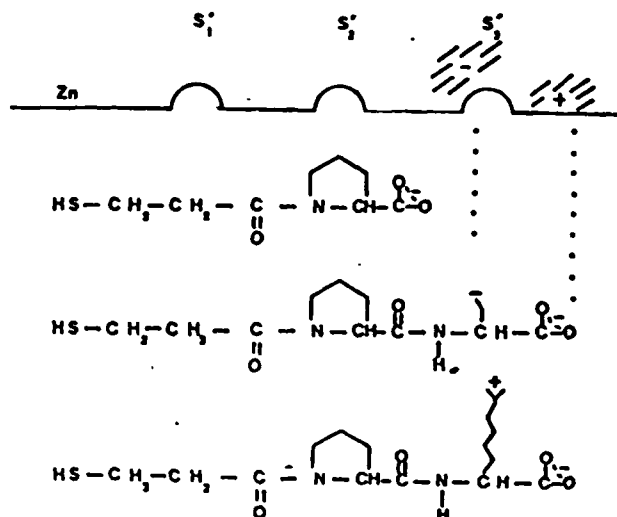
πτοπεπτίδια αναστολείς της *Achromobacter* κολλαγενάσης (Πίνακας 5<sub>1</sub>).

**Πίνακας 5<sub>1</sub>.** Αναστολή της *Achromobacter* *Isohagus* κολλαγενάσης από "θελο-προϊόντα".

Αναστολείς	$I_{c=50}$ (μM)
① Cys	> 20000
② Cys-Pro	1990
③ Cys-Pro-Ala	70
④ Cys-Pro-Leu	200
⑤ Cys-Gly-Ala	1250
⑥ 	1990
⑦ 	3160
⑧ 	100
⑧ HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>1</sup> -C <sup>2</sup> (=O)-Pro <sup>3</sup> Ala <sup>3</sup>	5
⑨ HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>1</sup> -C <sup>2</sup> (=O)-Pro <sup>3</sup> Ala <sup>3</sup> Gly <sup>4</sup>	5.



Τα κυριώτερα συμπεράσματα της εργασίας αυτής ήταν ότι τόσο το μέγεθος όσο και η αλληλουχία των αμινοξέων των θειοπεπτιδίων, παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανασταλτική δράση έναντι της *Achromobacter* κολλαγενάσης. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι το βέλτιστο μήκος για τον αναστολέα είναι το μήκος ενός τριπεπτιδίου, καθώς επίσης επισημαίνεται η μεγάλη εξειδίκευση που παρουσιάζει η  $S_1'$  υποπεριοχή του ενζύμου.



Συνέχεια της παραπάνω προσπάθειας αποτελεί μια σειρά νέων πειραμάτων που έγιναν από τους Γιωτάκη και Dive<sup>105</sup> οι οποίοι συνέθεσαν μια σειρά σουλφωδρυλο-πεπτιδία του γενικού τύπου:  $HS-CH_2-CH_2-CO-Pro-\gamma aa$  όπου  $\gamma aa = Ala, Leu, Phe, Pro, Hyp$ . Από τις τιμές των σταθερών αναστολής  $K_i$  (Πίνακας 5<sub>2</sub>) φαίνεται ότι η επίδραση της παράπλευρης ομάδας των αμινοξέων ( $Ala, Leu, Phe, Pro, Hyp$ ) υποδοχή  $S_3'$  του ενζύμου δεν επηρεάζει σημαντικά την ανασταλτική δράση. Αυτό σημαίνει ότι η υποδοχή  $S_3'$  δεν είναι αυστηρά εξειδικευμένη. Επίσης η ύπαρξη ελεύθερου καρβοξυλίου στη θέση  $P_3'$  είναι αποφασιστικής σημασίας για τη σύμπλεξη του αναστολέα με το ένζυμο.



**Πίνακας 52.** Τιμές σταθερών αναστολής  $K_i$  ( $\mu\text{M}$ ) της *Achromobacter-Iorhagus* κολλαγενάσης από σουλφυδρυλοπεπτίδια.

Προϊόν	Σταθερά αναστολής $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Σχετική βραστικότητα
I. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro	100	0.5
II. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-OMe	10	5
III. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Ala	2.1	24
IV. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Ala-OMe	8	6.25
V. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Leu	2.7	18
VI. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Phe	2.2	24
VII. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Pro	0.8	62
VIII. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Hyp	1	50
IX. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Arg	0.5	100
X. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Asp	70	0.7
XI. HS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Pro-Arg-OMe	0.6	83

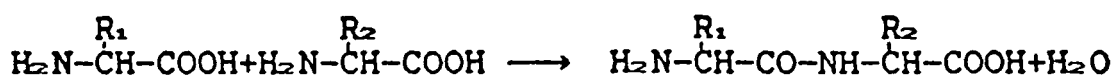


## VIII. Πεπτιδική σύνθεση

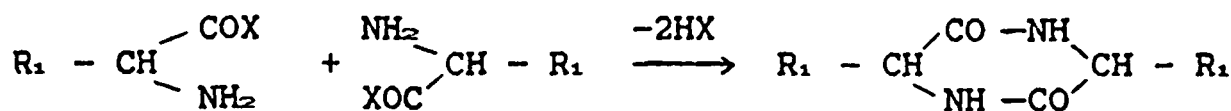
### VIII.1. Γενικές αρχές

Τα πεπτιδία οικοδομούνται από δύο ή περισσότερα αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς (πεπτιδικούς) δεσμούς.

Ο πεπτιδικός δεσμός προκύπτει με ακυλίωση της αμινομάδας ενός αμινοξέος από ένα δεύτερο αμινοξύ, μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής του αζώτου της αμινομάδας του ενός αμινοξέος πάνω στον άνθρακα της καρβοξυλομάδας του άλλου<sup>106</sup>.

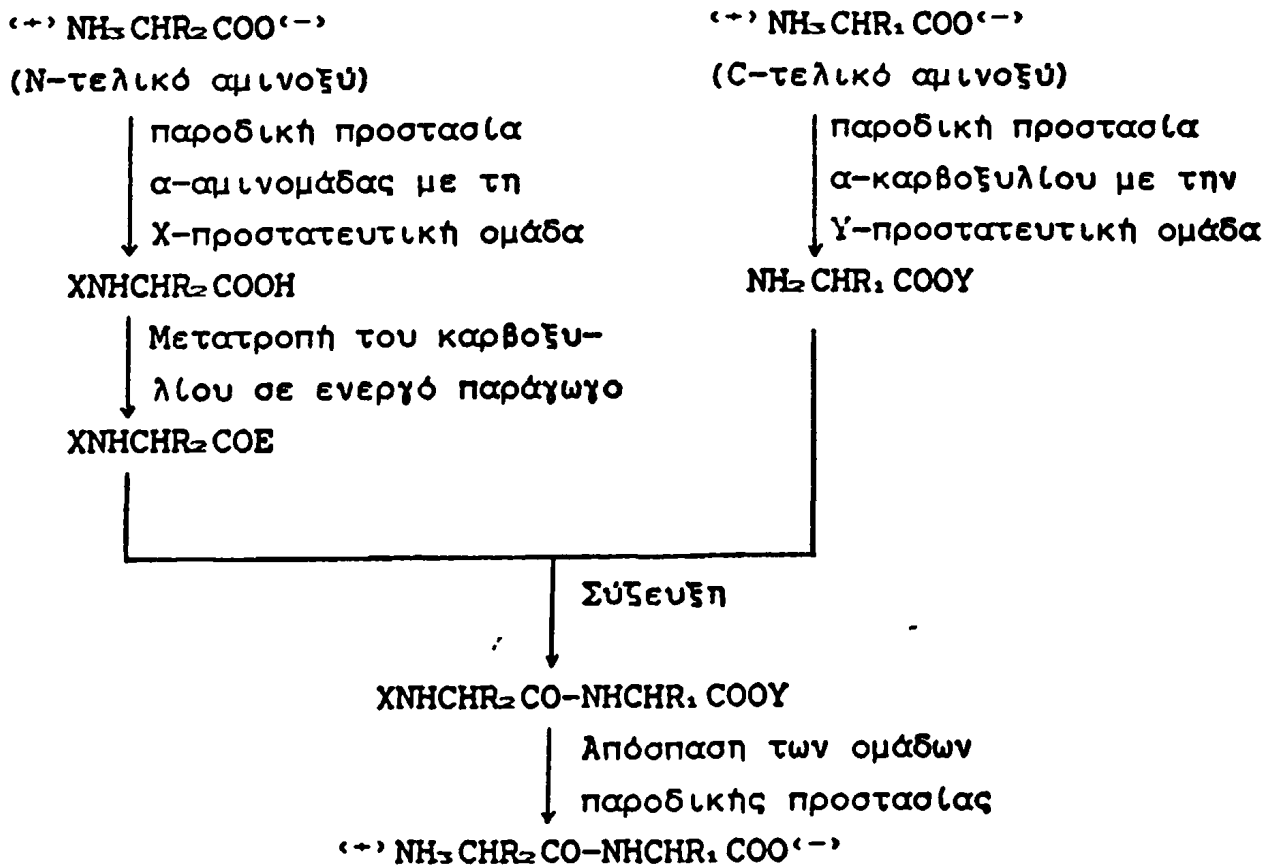


Καρβοξυλικά οξέα και αμίνες δεν αποδίδουν αμίδια αυθόρμητα, παρά μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες. Για το λόγο αυτό απαιτείται ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του αμινοξέος που θα δράσει σαν ακυλιωτικό μέσο (καρβοξυ-συστατικό) και κατάλληλη προστασία της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που θα ακυλιωθεί (αμινο-συστατικό). Εκτός από την προστασία της καρβοξυλομάδας του αμινο-συστατικού προκειμένου να παραχθεί ένα συγκεκριμένο διπεπτιδίο, πρέπει να προστατευθεί και η αμινομάδα του καρβοξυ-συστατικού, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός θεωρητικά πολυάριθμων άκυκλων και κυκλικών πεπτιδίων και κυρίως του κυκλικού διπεπτιδίου (δικετοπιπεραζόνης) που παράγεται με συμπύκνωση δύο μορίων του απροστάτευτου και ενεργοποιημένου καρβοξυ-συστατικού.



Κατά συνέπεια πρέπει όλες οι δραστικές ομάδες που δεν συμμετέχουν στη συγκεκριμένη σύζευξη, δηλαδή η αμινομάδα του καρβοξυ-συστατικού, η καρβοξυλομάδα του αμινοσυστατικού και κάθε δραστική ομάδα στις παράπλευρες αλυσίδες, να προστατεύονται παροδικά για να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν σύμφωνα με τα στάδια που απεικονίζονται στο σχήμα 39.





Σχήμα 39. Διάγραμμα σύνθεσης ενός διπεπτιδίου με ενεργοποίηση του καρβοξυλλου.

VIII.2. Τα στάδια της πεπτιδικής σύνθεσης

Σε γενικές γραμμές η σύνθεση ενός πεπτιδίου περιλαμβάνει τα εξής πέντε στάδια<sup>106, 107</sup>.

Α) Προστασία της αμινομάδας του καρβοξυ-συστατικού με εισαγωγή ομάδων που μειώνουν την πυρηνοφιλία της. Μια τέτοια προστατευτική ομάδα δεν πρέπει να επηρεάζει την στερεοχημική φύση του αμινοξέος ή του πεπτιδίου, ενώ πρέπει να είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης, απομόνωσης και καθαρισμού του πεπτιδίου και τέλος πρέπει να απομακρύνεται εύκολα με μέσα που δεν καταστρέφουν τον πεπτιδικό δεσμό. Οι ομάδες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την προστασία των αμινομάδων είναι η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα<sup>108</sup> (Z), η t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα<sup>109</sup> (BOC), η π-τολουολο-σουλφονυλο-ομάδα (tosyl ομάδα) και η



9-φλουορενυλ-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc).

Β) Προστασία του καρβοξυλίου του αμινο-συστατικού με εισαγωγή ομάδων που αυξάνουν την πυρηνοφιλία του αμινοξέος ή πεπτιδίου. Η προστασία της καρβοξυλομάδας επιτυγχάνεται συνήθως με μετατροπή της σε μεθυλ-, αιθυλ-, βενζυλ- και t-βουτυλυστέρα. Ο μεθυλ- και αιθυλεστέρας απομακρύνονται με σαπωνοποίηση σε μίγμα αλκάλειωσ και οργανικού διαλύτη, ενώ ο βενζυλεστέρας απομακρύνεται με καταλυτική υδρογόνωση.

Γ) Προστασία των πλευρικών δραστικών ομάδων, αν υπάρχουν, ώστε να μην παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού. Τέτοιες ομάδες είναι π.χ. το β-COOH του ασπαρτικού, το γ-COOH του γλουταμινικού, η -SH ομάδα της κυστεΐνης, το -OH της τυροσίνης.

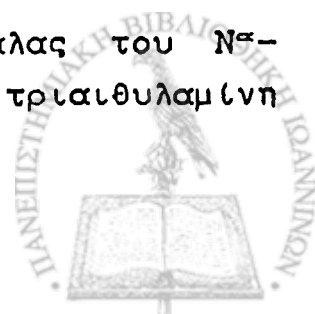
Δ) Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας που θα δώσει τον πεπτιδικό δεσμό με σχηματισμό ακυλο-παραγώγου και σύζευξη του ενεργού αυτού καρβοξυσυστατικού με το αμινο-συστατικό.

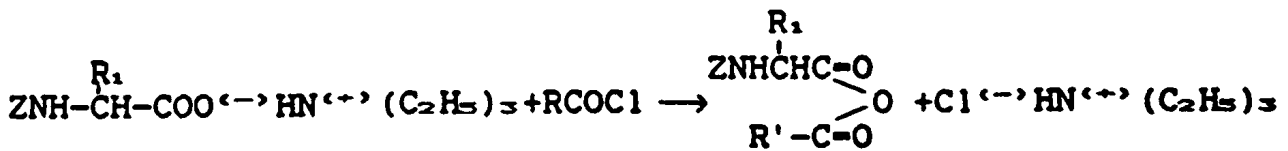
Ε) Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων με μέσα που δεν διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς προκειμένου να παραχθεί το ελεύθερο πεπτίδιο.

### VIII.3. Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα

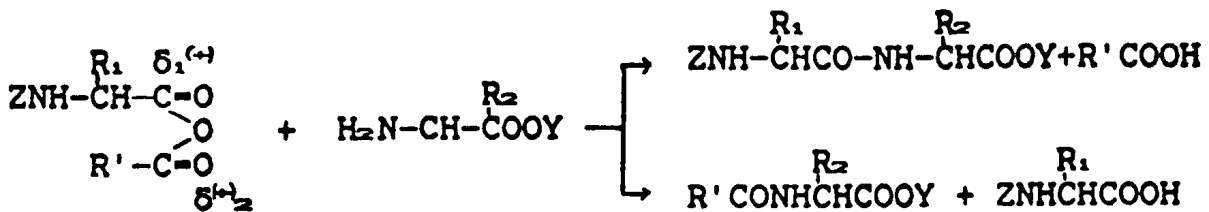
Είναι η πρώτη μεθοδολογία που εφαρμόσθηκε για τη σύνθεση των πεπτιδίων και σύμφωνα με την οποία η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται "βήμα προς βήμα" σε όμογενές διάλυμα. Η απομόνωση και ο καθαρισμός των ενδιαμέσων προϊόντων της σύνθεσης επιτυγχάνεται με τις κλασσικές μεθόδους της οργανικής σύνθεσης (εκχύλιση, διήθηση, έκπλυση, κρυστάλλωση, ανακρυστάλλωση). Για το στάδιο της ενεργοποίησης του καρβοξυλίου υπάρχει η δυνατότητα επιλογής, ανάλογα με την περίπτωση, μεταξύ των μεθόδων, των ανυδριτών, των ενεργών εστέρων, των αζιδίων και του καρβοδιϊμιδίου.

Οι μικτοί ανυδρίτες παρασκευάζονται από άλας του N<sup>ε</sup>-προστατευμένου αμινοξέος με τριτοταγή βάση π.χ. τριαιθυλαμίνη και το χλωρίδιο του βοηθητικού οξέος.



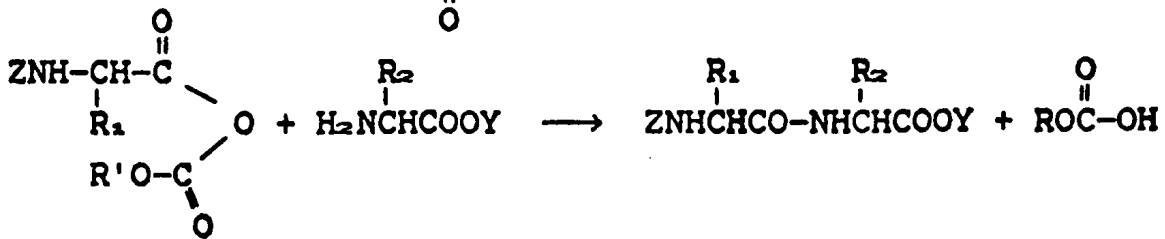


και στη συνέχεια αντιδρούν με το αμινοσυστατικό για το σχηματισμό του διπεπτιδίου

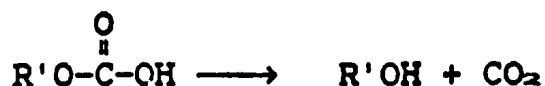


Εφ' όσον ο μικτός ανυδρίτης έχει δύο καρβονυλικές ομάδες, η αμινομάδα θα αντιδράσει και με τα δύο ηλεκτρονιόφιλα κέντρα, με διαφορετική όμως ταχύτητα την οποία μπορούμε να εξασφαλίσουμε προς όφελος του αμινοξέος με την κατάλληλη εκλογή του R' ( $\delta_1^{+} > \delta_2^{+}$ ). Επίσης ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται είναι η απομάκρυνση του βοηθητικού οξέος μετά τη σύζευξη, καθόσον περίσσεια βάσεως κατά τη διάρκεια της σύζευξης προκαλεί μερικές φορές ρακεμίωση.

Γι' αυτούς τους λόγους η εισαγωγή των μικτών ανυδριτών με παράγωγα ανθρακικού οξέος βελτίωσε σημαντικά τη μέθοδο. Στους ανυδρίτες του τύπου αυτού, οι οποίοι παρασκευάζονται εύκολα από χλωρομυρμηκικούς εστέρες (R'OCOC1), η ομάδα R'O- δρα σαν δότης ηλεκτρονίων  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\ddot{\text{O}}\text{R}$ , εξασφαλίζοντας έτσι  $\delta_1^{+} > \delta_2^{+}$ .



Επίσης κατά την αντίδραση σύζευξης με τέτοιους ανυδρίτες, ελευθερώνεται ανθρακικός μονοεστέρας ο οποίος διασπάται αμέσως σε CO<sub>2</sub> και αλκοόλη.

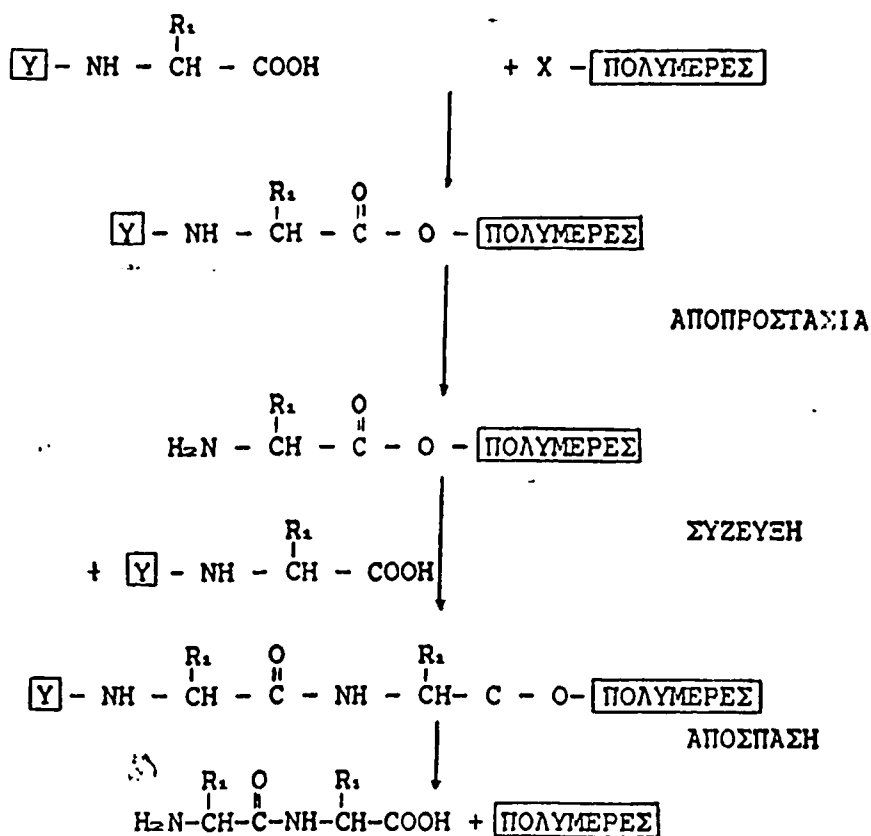


Ετσι δεν απαιτείται προσθήκη βάσης για την εξουδετέρωση του βοηθητικού οξέος, αλλά και η απομάκρυνση των παραπροϊόντων της αντίδρασης γίνεται αυτόματα, χωρίς ιδιαίτερη φροντίδα. Η σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα είναι μια τεχνική η οποία αφ'ενός μεν δίνει την δυνατότητα αναλυτικού ελέγχου στην πορεία σύνθεσης βήμα προς βήμα, αφ'ετέτου δε απαιτεί ιδιαίτερη εργαστηριακή περίθαλψη.

#### VIII.4. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (Μέθοδος Merrifield)

Σύμφωνα με τη μέθοδο Merrifield<sup>1,2,3</sup> το C-τελικό αμινοξύ της πεπτιδικής αλυσίδας συγκρατείται με ομοιοπολικό δεσμό πάνω σε "στερεό" υπόστρωμα (πολυμερές), δηλαδή ένα υλικό αδιάλυτο στα διαλυτικά που χρησιμοποιούνται. Η πεπτιδική αλυσίδα μεγαλώνει προσθέτοντας ένα-ένα τα αμινοξέα πάνω στο πολυμερές.

Στο σχήμα 40 δίνεται ένα διάγραμμα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.



**Σχήμα 40.** Βασική αρχή της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση.



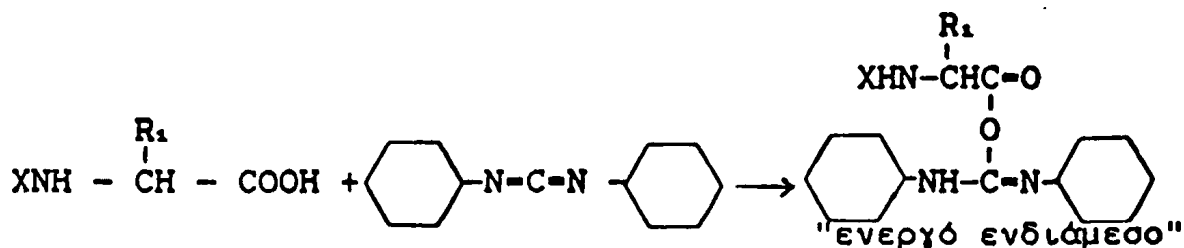


1) Σαν στερεή φάση χρησιμοποιούνται συμπολυμερή που παρασκευάζονται από ένα μίγμα στυρολίου και διβινυλοβενζολίου (DVB), που φέρουν στο μόριό τους σκορπισμένες δραστικές ομάδες που θα επιτρέψουν τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού με το C-τελικό αμινοξύ της πεπτιδικής αλυσίδας του οποίου η αμινομάδα είναι προστατευμένη από μία κατάλληλη ομάδα (Y).

2) Η αποπροστασία της αμινομάδας γίνεται εκλεκτικά και σε συνθήκες, που δεν επηρεάζουν το δεσμό αμινοξέος-ρητίνης.

3) Ακολουθεί η σύζευξη, κατά την οποία προστίθεται το κατάλληλο N-προστατευμένο αμινοξύ για το σχηματισμό του πρώτου πεπτιδικού δεσμού. Η συνηθέστερη μέθοδος σύζευξης σε στερεή φάση είναι η μέθοδος του καρβοδιϊμιδίου.

Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCCI)<sup>1,2</sup> αντιδρά εύκολα με την καρβοξυλομάδα, ενώ η αντίδρασή του με την αμινομάδα θεωρείται αμελητέα. Κατά την αντίδραση αυτή σχηματίζεται ένα "ενεργό ενδιάμεσο προϊόν" (ο-ακυλισσοουρία) από το οποίο είναι δυνατόν:

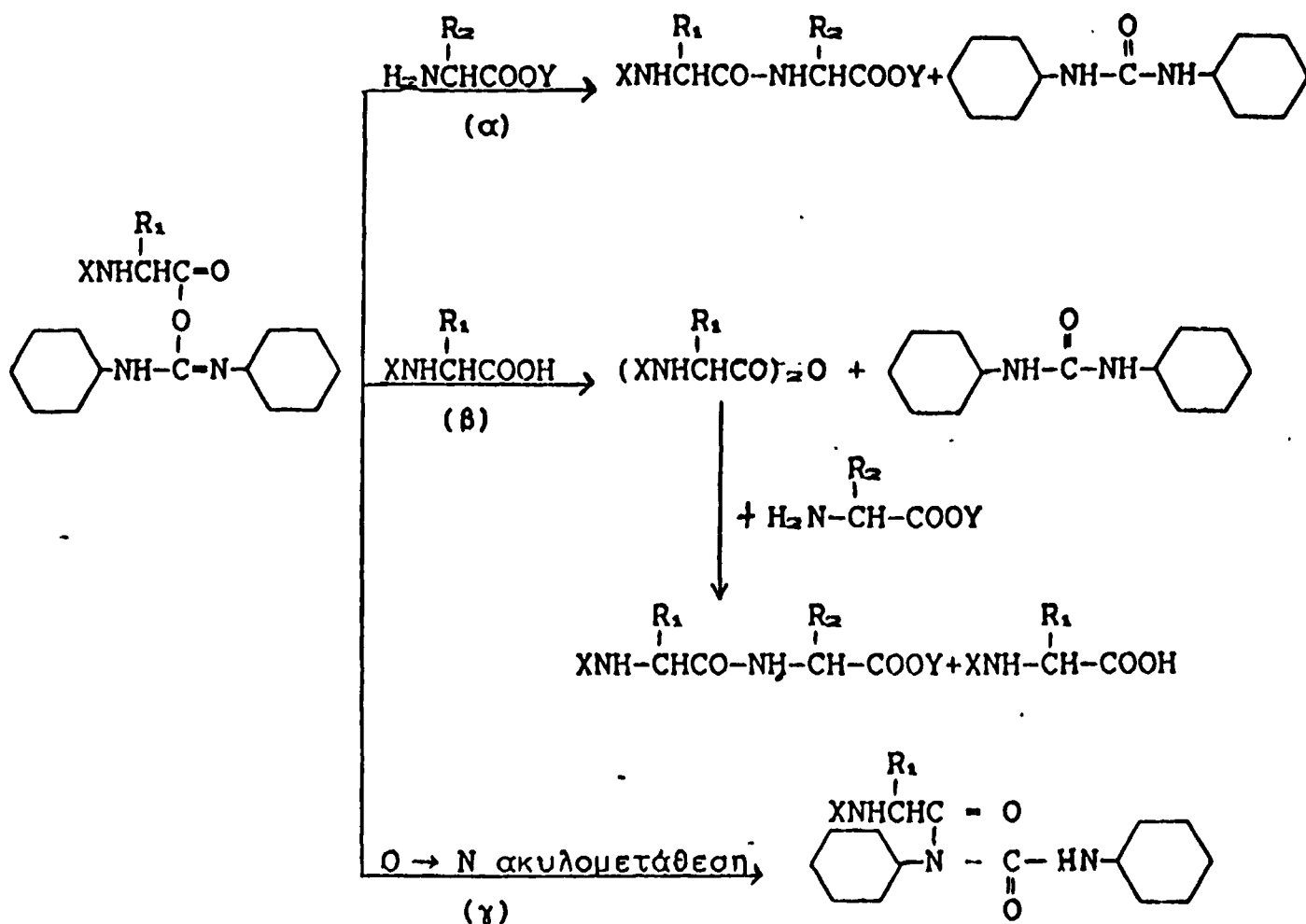


α) να σχηματισθεί πεπτιδικός δεσμός με άμεση προσβολή του αμινο-συστατικού στο ενεργό ενδιάμεσο και παραγωγή N-N'δικυκλοεξουρίας.

β) να σχηματισθεί συμμετρικός ανυδρίτης ο οποίος στη συνέχεια ακυλιώνει την αμίνη και δίνει πάλι πεπτιδικό δεσμό.

γ) να παραχθεί ένα δυσδιάλυτο παραπροϊόν, η N-ακυλουρία, μέσω μιας O → N ενδομοριακής ακυλομετάθεσης στο ενεργό ενδιάμεσο. Την παραπάνω μετατόπιση O → N παρεμποδίζει ή μειώνει στο ελάχιστο η χρησιμοποίηση κατάλληλων μη πολικών διαλυτών και κυρίως το διχλωρομεθανό<sup>1,2,3</sup> (σχ.41).

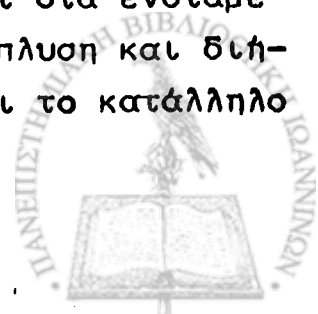




**Σχήμα 41.** Οι τρεις δυνατές πορείες αντίδρασης του "ενεργού ενδιάμεσου" κατά τη σύζευξη με τη μέθοδο του καρβοδιιμιδίου.

4) Στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση διασπάται εκλεκτικά ο δεσμός του πρώτου αμινοξέος με την ρητίνη, απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες και το ελεύθερο πεπτίδιο παραλαμβάνεται σε διάλυμα. Το πλέον εύχρηστο αντιδραστήριο για την αποπροστασία και απομάκρυνση των πεπτιδίων από το στερεό υπόστρωμα, είναι το άνυδρο HF, το οποίο οδηγεί σε μεγάλες αποδόσεις και αρκετά καθαρά προϊόντα<sup>1,2,4</sup>.

Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι παραλείπονται όλοι οι εργαστηριακοί καθαρισμοί που γίνονται στα ενδιάμεσα στάδια της σύνθεσης και αντικαθίστανται με έκπλυση και διήθηση του στερεού. Χρησιμοποιώντας μάλιστα και το κατάλληλο

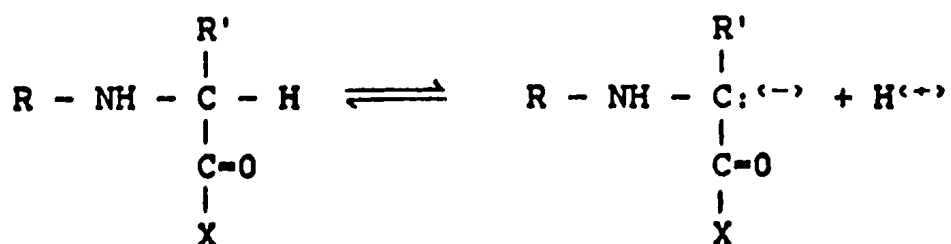


δοχείο, η σύνθεση μπορεί να γίνει μέσα σ' αυτό, χωρίς καμιά μεταφορά υλικού από το ένα δοχείο στο άλλο, ώστε να αποφεύγονται τυχόν μηχανικές απώλειες υλικού εξαιτίας μεταφοράς. Η όλη διαδικασία απλουστεύεται και συντομεύει ακόμη περισσότερο επειδή η μέθοδος επιδέχεται αυτοματοποίηση.

### VIII.5. Προβλήματα ρακεμίσωσης κατά την πεπτιδική σύνθεση

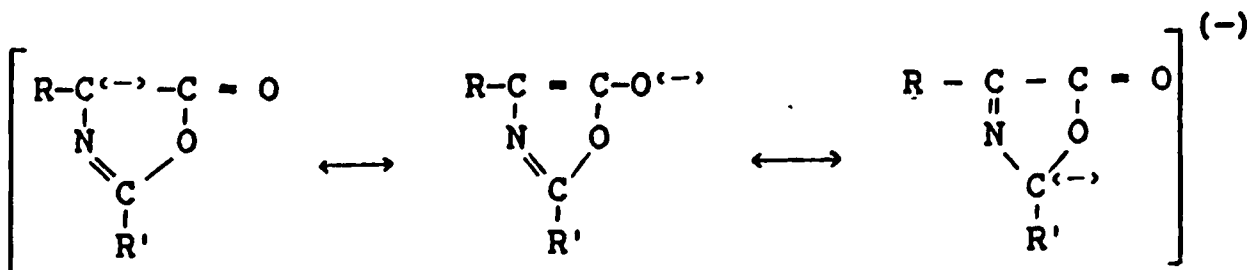
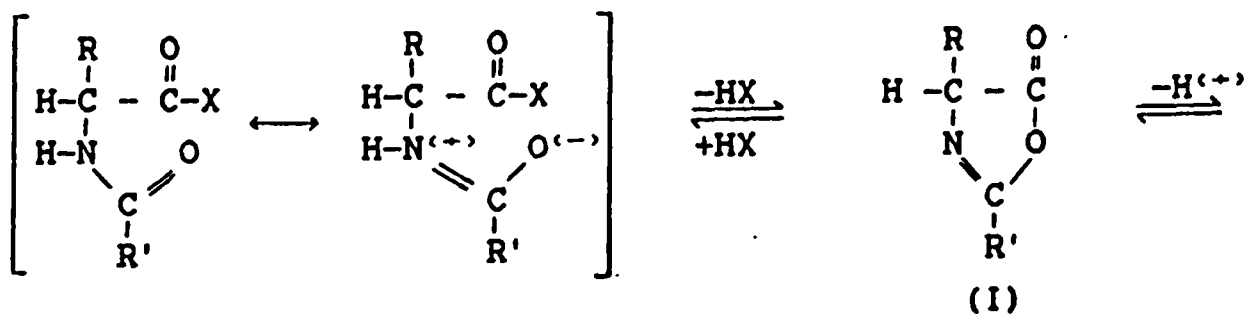
Μια ικανοποιητική πεπτιδική σύνθεση πρέπει να γίνεται χωρίς να επηρεάζεται η διαμόρφωση των ασύμμετρων κέντρων των συστατικών που συμμετέχουν. Εφ' όσον η βιολογική δράση των πεπτιδίων και πολυπεπτιδίων εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την οπτική τους καθαρότητα πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στο πρόβλημα της ρακεμοποίησης. Η απομάκρυνση τυχόν προσμελεξών λόγω ρακεμοποίησης μπορεί να γίνει με κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση ή με χρωματογραφικές μεθόδους. Χαρακτηριστικό είναι ότι αρκεί μια μικρή απώλεια στην οπτική ομοιογένεια σε κάθε στάδιο της σύνθεσης για να καταστραφεί τελείως η στερεοχημεία του τελικού προϊόντος.

Η ρακεμοποίηση μπορεί να αποδοθεί με το μηχανισμό μιας ισορροπίας ιονισμού του C<sup>α</sup>-H δεσμού



Η ισορροπία αυτή καταλύεται από οξέα και βάσεις, ιδιαίτερα σε υψηλή θερμοκρασία και πολικούς διαλύτες. Η ρακεμοποίηση όμως που καταλύεται από οξέα γίνεται συνήθως σε χαμηλό pH και υψηλή θερμοκρασία, συνθήκες που δεν συνηθίζονται κατά την πεπτιδική σύνθεση. Μεγάλη σημασία αντίθετα έχει η ρακεμοποίηση που καταλύεται από βάσεις, η οποία μπορεί να αποδοθεί με δύο μηχανισμούς είτε απ' ευθείας απόσπαση του πρωτονίου του C<sup>α</sup>-H δεσμού, είτε με σχηματισμό μιας αζλακτόνης (I).





Για τον προσδιορισμό της ρακεμίσωσης, έχουν περιγραφεί διάφορες φυσικές, βιολογικές και ενζυμικές μέθοδοι. Με κατάλληλη επιλογή των συνθηκών κατά την διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι δυνατόν να περιορισθεί στο ελάχιστο η απώλεια της οπτικής ενεργότητας.

### VIII. 6. Retro-Inverso πεπτιδία

Για τον σχεδιασμό αναλόγων βιολογικά ενεργών πεπτιδίων έχουν αναφερθεί κατά καιρούς διάφορες μελέτες.

Ο Shemyakin και συνεργάτες του<sup>215</sup> ήταν ο πρώτος που εισήγαγε μια νέα μορφή πεπτιδίων που ονομάστηκαν "retro-ισομερή".

Απο την εποχή που οι Shemyakin και Orchinnikov εφάρμοσαν την έννοια αυτή τόσο σε κυκλικά πεπτιδία όσο και σε κυκλικά δεσμιπεπτιδία μέχρι σήμερα, έχουν γίνει πολλές συστηματικές μελέτες<sup>216, 217</sup> με αποτέλεσμα να έχουν διευκρινισθεί πλήρως παρεμφερείς έννοιες όπως retro-ισομερή, retro-inverso ισομερή, retro inverso ισομερή με τροποποιημένες τελικές ομάδες και μερικώς τροποποιημένα retro-inverso ισομερή.



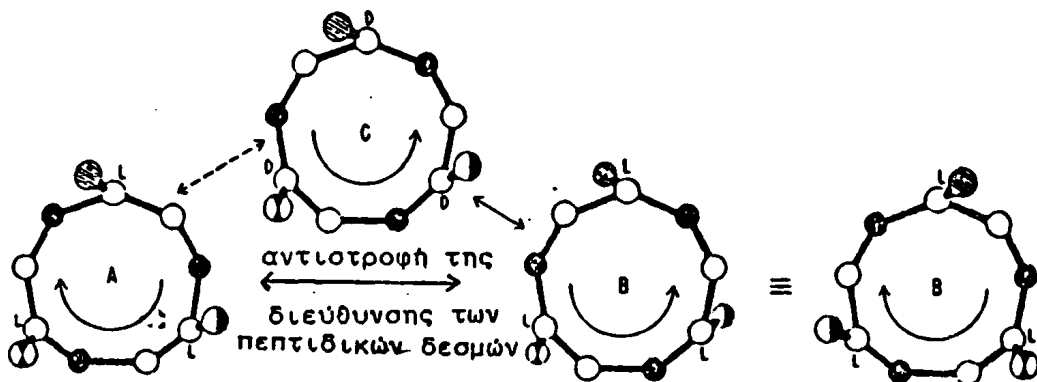
Retro-ισομερές: Είναι το ισομερές του οποίου οι πεπτιδικοί δεσμοί έχουν αναστραφεί με σύγχρονη διατήρηση της χειρικότητας των αμινοξέων.

Retro-*inverso* ισομερές: Είναι το ισομερές ενός γραμμικού πεπτιδίου του οποίου οι πεπτιδικοί δεσμοί και η χειρικότητα των υπάρχοντων αμινοξέων έχει αναστραφεί.

Retro *inverso* ισομερές με τροποποιημένες τελικές ομάδες: Είναι το retro *inverso* ισομερές του οποίου όμως το άμινο-και καρβόξυλο-τέλος έχει τροποποιηθεί ώστε να υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ του τελικού και αρχικού πεπτιδίου.

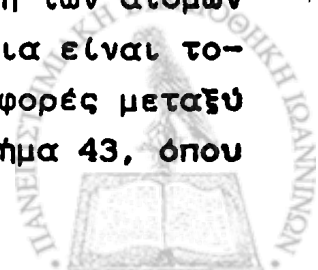
Μερικώς τροποποιημένο retro-*inverso* ισομερές: Είναι το ισομερές ενός γραμμικού πεπτιδίου, στο οποίο οι πεπτιδικοί δεσμοί ενός τμήματος αυτού και η χειρικότητα των υπάρχοντων σ' αυτό το τμήμα αμινοξέων έχει αντιστραφεί.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι Shemyakin και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που συνέθεσαν κυκλικά τριπεπτίδια και τα αντιστοιχία ισομερή τους αντιστρέφοντας τη φορά των πεπτιδικών δεσμών (σχ.42). Τα πεπτίδια Α και Β του σχήματος 42 είναι

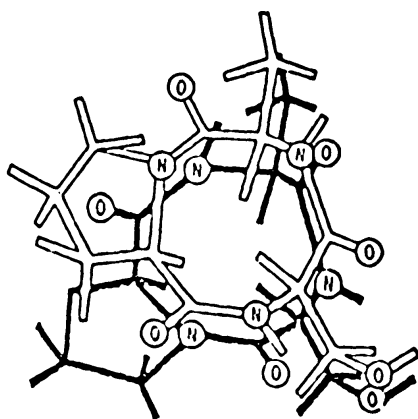


**Σχήμα 42.** Σχηματική παράσταση των κυκλοϊσομερών του κυκλικού-ολα-L-τριπεπτιδίου Α, Β: retro-ισομερές, C: retro-*inverso* ισομερές.  $\longleftrightarrow$  η διεύθυνση του αμιδικού δεσμού.

τοπολογικά όμοια και διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση των ατόμων των αμιδικών ομάδων (CO-NH και NH-CO), με άλλα λόγια είναι τοποχημικά ανάλογα. Οι υπάρχουσες ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των πεπτιδίων Α και Β εμφανίζονται καλύτερα στο σχήμα 43, όπου



με μαύρο έντονο περιγράμμα απεικονίζεται το δεύτερο πεπτιδίο και η παράσταση αυτή δείχνει καθαρά πόσο δομικά όμοια είναι τα δύο πεπτιδία και επομένως γιατί παρουσιάζουν συχνά ίδιες βιολογικές ιδιότητες<sup>129</sup>.



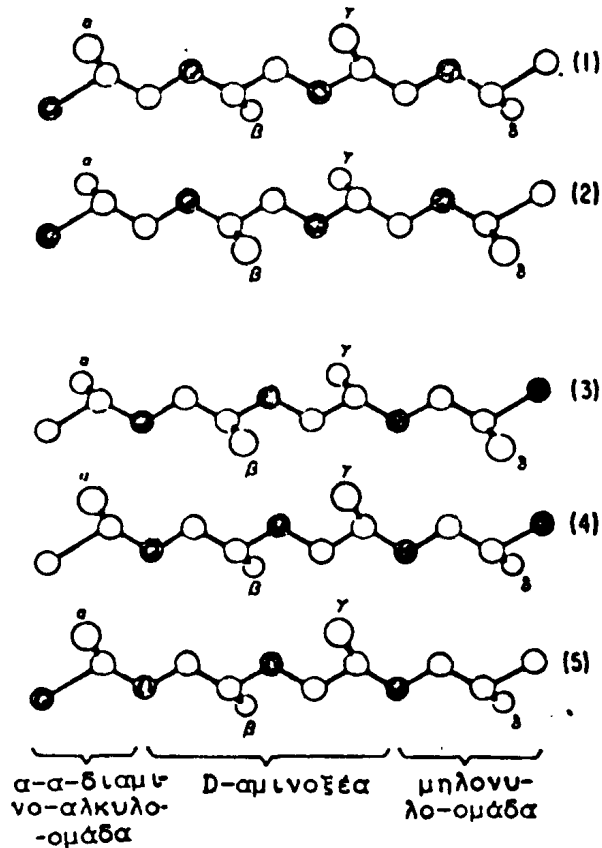
**Σχήμα 43.** Σχέση μεταξύ των δομών ενός κυκλικού πεπτιδίου και του retro-εναντιομερούς του.

Η έννοια όμως του retro-ισομερούς δεν εφαρμόστηκε μόνο σε κυκλικά πεπτιδία, αλλά επεκτάθηκε και σε γραμμικά βιολογικά ενεργά πεπτιδία, τα οποία ως γνωστό αντίθετα με τα κυκλικά πεπτιδία έχουν αμινο- και καρβόξυλο-τέλος.

Τα διαφορετικά στερεοϊσομερή και δομικά ισομερή ενός γραμμικού πεπτιδίου απεικονίζονται στο σχήμα 44.

Οι δομές 1 και 2 είναι εναντιομερείς καθώς και οι 3 και 4. Η δομή 3 είναι ένα retro-ισομερές της 1 δηλ. ενώ η διεύθυνση των αμιδικών δεσμών έχει αντιστραφεί η χειρικότητα των αμινοξέων παραμένει η ίδια. Το ίδιο ισχύει και για τις δομές 2 και 4. Μια διαφορετική τοποχημική σχέση επικρατεί στα ζευγάρια 1,4 καθώς και στα 2,3. Σ' αυτά τα ζεύγη δομών ενώ η διεύθυνση των δεσμών έχει αλλάξει και η χειρικότητα των υπάρχοντων αμινοξέων έχει αντιστραφεί, οι παράπλευρες αλυσίδες διατηρούν την ίδια διάταξη στο χώρο.

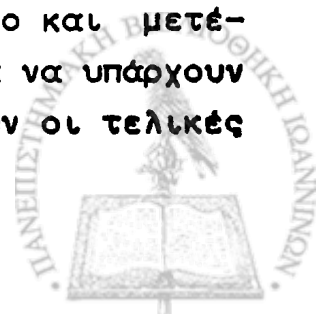




**Σχήμα 44.** Τα ισομερή ενός γραμμικού αρχικού (ολα-L) πεπτιδίου (1), (2): τα εναντιομερές, (3): retro-ισομερές, (4): retro-ολα-D-ισομερές, (5): retro-ολα-D-ισομερές με τροποποιημένες τις τελικές ομάδες.  
 O = C, ● = N, α, β, γ, δ = παράπλευρες ομάδες.

Η αντιστροφή του αμινο-και καρβόξυλο-τέλους δημιουργεί ένα μεγάλο πρόβλημα ως προς την συμπληρωματικότητα των δομών των γραμμικών αυτών πεπτιδίων. Συγκεκριμένα ενώ οι ομάδες α και δ στη δομή 1 είναι στα αμινο και καρβόξυλο-άκρα της αλυσίδας αντίστοιχα, οι ίδιες παράπλευρες αλυσίδες στη δομή 4 βρίσκονται συνδεδεμένες αντίστροφα.

Ενας γενικός τρόπος επίλυσης αυτού του προβλήματος δίνεται μέσω της δομής 5 (σχ.44) κατά την οποία ένα α-α-διαμινο-αλκύλιο και ένα C-2-υποκατεστημένο μηλονικό οξύ αντικαθιστούν τα αμινο-και καρβόξυλο-άκρα αντίστοιχα της δομής 4. Το πρόβλημα των τελικών ομάδων στα γραμμικά πεπτιδία έχει απασχολήσει από την αρχή τόσο την ομάδα των Ρώσων ερευνητών όσο και μετέπειτα τους Morley<sup>117</sup> και Goodman<sup>118</sup>, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σήμερα πολυάριθμες τροποποιήσεις, μέσω των οποίων οι τελικές



ομάδες μπορεί να δεσμευθούν, αφαιρεθούν ή διατηρηθούν.

Ανεξάρτητα όμως από το πρόβλημα των τελικών ομάδων και τις δυνατότητες που υπάρχουν για να ξεπερασθεί, οι retro-inverso τροποποιήσεις γραμμικών πεπτιδίων περικλείουν αναστροφή των πεπτιδικών δεσμών, που επιτυγχάνεται με αντιστροφή της χειρικότητας των αμινοξέων, ενώ συγχρόνως οι παράπλευρες αλυσίδες διατηρούν την κατάλληλη χωροδιάταξη. Εάν στο αρχικό πεπτίδιο τα υπάρχοντα αμινοξέα είναι όλα-L- διαμόρφωσης, το αντιστοιχο retro-inverso ισομερές του, θα περιέχει αμινοξέα μόνο -D-στερεοχημικής διάταξης. Τυπικά παραδείγματα τέτοιων πεπτιδίων είναι το retro-ολα-D-βραδυκινίνη<sup>120</sup>, retro-ολα-D-tyftsin<sup>121</sup>.

Αν και η τεχνική των retro-inverso ισομερών βιολογικά ενεργών γραμμικών πεπτιδίων, ιδιαίτερα ορισμένων ορμονών και αντιβιοτικών, βρίσκεται ακόμη σε αρχικά στάδια, ωστόσο έχει συμβάλει σημαντικά στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ορμόνης-υποδοχέα. Επίσης εφ'όσον στη φύση όλα τα πεπτίδια αποτελούνται από L-αμινοξέα, τα retro-inverso ισομερή θα αποτελούνται μόνο από D-στερεοχημικής διάταξης αμινοξέα και επομένως ίσως να είναι ανθεκτικά έναντι της πρωτεολυτικής δράσης των ενζύμων στον οργανισμό και συνεπώς να χαρακτηρίζονται από σταθερότερη βιολογική δράση. Τέλος η τεχνική αυτή θα μπορούσε να εφαρμοσθεί για το σχεδιασμό αναλόγων υποστρωμάτων και αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα να εξαχθούν πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.





## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ

### IX.1. Διαγραμματική πορεία σύνθεσης πεπτιδικών αναστολέων σε υγρά και στερεή φάση

#### IX.1.1. Γενικό σχεδιάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρά φάση

Για τη σύνθεση ορισμένων δι- και τριπεπτιδίων ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία σε υγρά φάση: α) παροδική προστασία α-αμινομάδας, β) παροδική προστασία και ενεργοποίηση καρβοξυλίου γ) σύζευξη και δ) απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων.

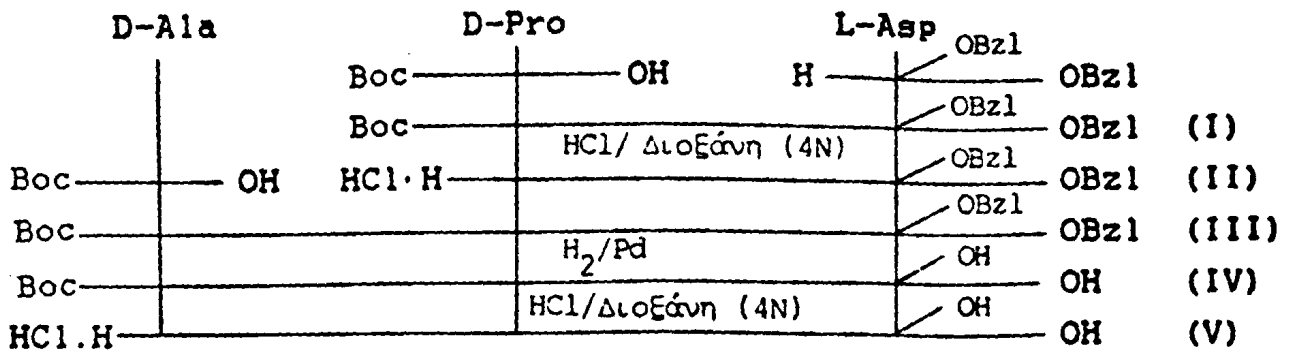
Η προστασία της α-αμινομάδας έγινε με τη βοήθεια της t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδας (Boc). Η Boc ομάδα μετά το τέλος της σύζευξης απομακρύνθηκε εύκολα με κατεργασία υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Η προστασία της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος έγινε με μετατροπή της σε αλκυλεστέρα. Συγκεκριμένα η προστασία της α-καρβοξυλομάδας της γλυκίνης και των α, β καρβοξυλομάδων του -L-ασπαρτικού οξέος, έγινε με μετατροπή τους σε μεθυλεστέρα ο οποίος μετά την ένταξή του στην πεπτιδική αλυσίδα σαπωνοποιήθηκε, ενώ σε άλλα πεπτιδία η προστασία της α και β καρβοξυλομάδας του -L-ασπαρτικού έγινε με μετατροπή σε βενζυλεστέρα, ο οποίος απομακρύνθηκε με καταλυτική υδρογόνωση.

Σε όλες τις συζεύξεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικτών ανυδριτών, η οποία έδωσε προϊόντα με καλή απόδοση και καθαρότητα.

Στη συνέχεια περιγράφεται η πορεία της σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Asp (V) η οποία διαγραμματικά φαίνεται στο σχήμα 45.

Ο N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-ασπαρογλινοδιβενζυλεστέρας (I) παρασκευάστηκε με τη μέθοδο των μικτών ανυδριτών και κατεργασία του (I) με HCl σε διοξάνη, έδωσε το αντιστοιχο υδροχλωρικό άλας (II).





**Σχήμα 45.** Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Asp.

Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης με το διπεπτιδίο (II) έδωσε τον N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγλινοδιβενζυλεστέρα (III). Με καταλυτική υδρογονόλυση του (III) παρασκευάσθηκε το τριπεπτιδίο N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγλινικό οξύ (IV) με ελεύθερα τα δύο καρβοξύλια. Με επίδραση υδροχλωρίου σε διοξάνη 4N παρασκευάσθηκε το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας του τριπεπτιδίου (V).

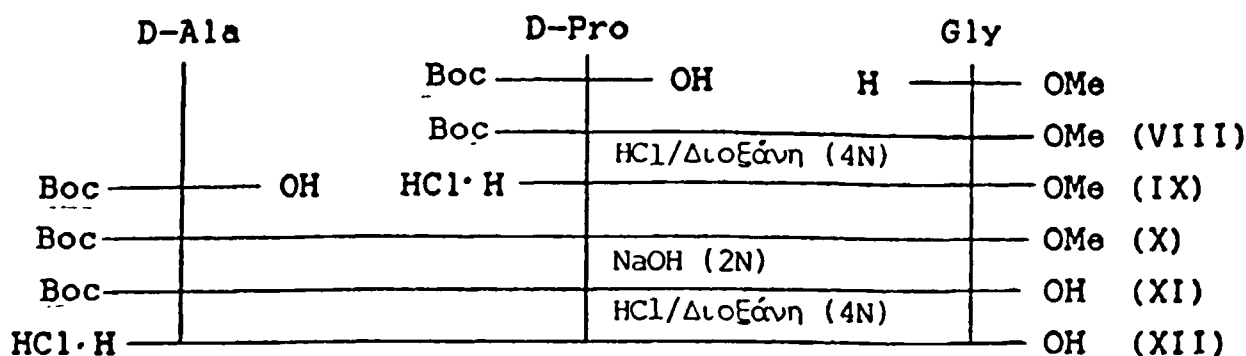
Η αποπροστασία του διπεπτιδίου (I) έγινε όπως και στο τριπεπτιδίο (III).

Η πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-Gly (XII) περιγράφεται παρακάτω (σχ.46).

Ο N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-γλυκλινομεθυλεστέρας (VIII) παρασκευάσθηκε με την μέθοδο των μικτών ανυδριτών. Με επίδραση υδροχλωρίου σε διοξάνη το (VIII) έδωσε το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας (IX).

Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης με το διπεπτιδίο (IX) έδωσε τον N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλογλυκλινομεθυλεστέρα (X). Με σαπωνοποίηση του (X) παρασκευάσθηκε το τριπεπτιδίο N-t-βουτυλοκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλογλυκίνη (XI) με ελεύθερο το καρβοξύλιο και εν συνεχεία με επίδραση υδροχλωρίου σε διοξάνη παίρνουμε το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας του τελικού τριπεπτιδίου (XII).

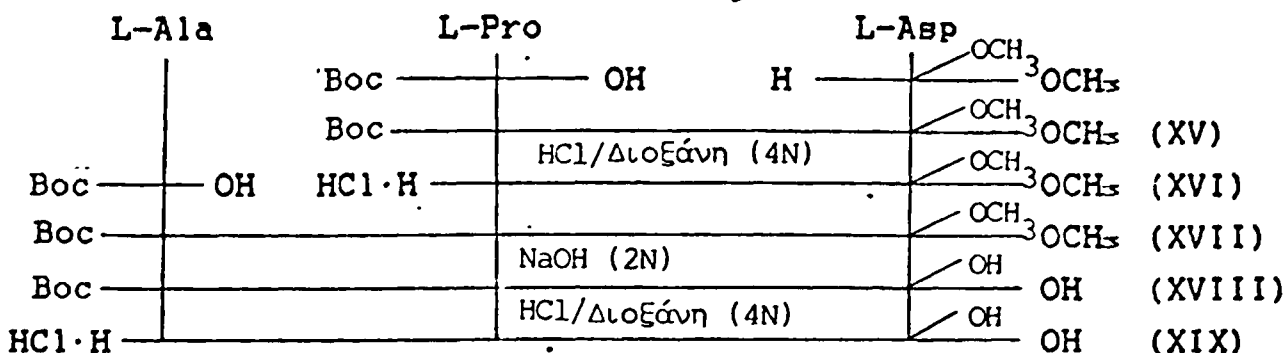




**Σχήμα 46.** Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-Gly.

Η αποπροστασία του διπεπτιδίου (VIII) έγινε όπως και στο τριπεπτιδίο (X).

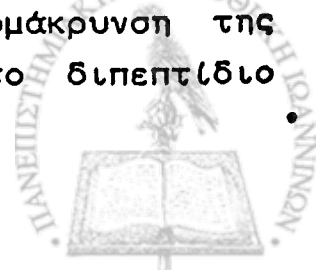
Η πορεία της σύνθεσης του πεπτιδίου L-Ala-L-Pro-L-Asp (XIX) περιγράφεται παρακάτω (σχ.47).



**Σχήμα 47.** Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου L-Ala-L-Pro-L-Asp.

Ο N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινοδιμεθυλεστέρας (XV) παρασκευάσθηκε με τη μέθοδο των μικτών ανυδριτών.

Στο ένα μέρος της ποσότητας αυτού, απομακρύνθηκε ο α και β-μεθυλεστέρας του ασπαρτικού με σαπωνοποίηση και αμέσως μετά επεξεργάθηκε με υδροχλώριο σε διοξάνη προς απομάκρυνση της t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδας οπότε ελήφθη ελεύθερο το διπεπτιδίο (XX).



Το άλλο μέρος της ποσότητας του διπεπτιδίου (XV) μετατράπηκε στο αντίστοιχο άλας (XVI) με επίδραση υδροχλωρίου σε διοξάνη.

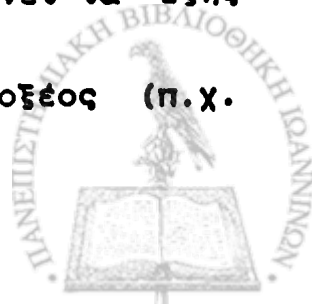
Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανίνης με το διπεπτιδιο (XVI) έδωσε τον N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινοδιμεθυλεστέρα (XVII). Σαπωνοποίηση του (XVII) έδωσε το τριπεπτιδιο N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (XVIII) με ελεύθερα τα α, β καρβοξύλια, το οποίο στη συνέχεια με επίδραση υδροχλωρίου σε διοξάνη (4N) έδωσε το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας του τριπεπτιδίου L-Ala-L-Pro-L-Asp (XIX).

#### IX.1.2. Γενικό σχεδιάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση

Για τη σύνθεση ορισμένων άλλων δι- και τριπεπτιδίων ακολουθήθηκε η παρακάτω περιγραφόμενη τακτική, όπου αντιμετωπίστηκαν τα προβλήματα της σύνθεσης σε στερεή φάση: α) παροδική προστασία της α-αμινομάδας του C-τελικού αμινοξέος του υπό σύνθεση πεπτιδίου, β) προσκόλληση του C-τελικού αμινοξέος στο στερεό πολυμερές, γ) απόσπαση της N-προστατευτικής αμινομάδας του C-τελικού αμινοξέος, δ) ενεργοποίηση του προτελευταίου αμινοξέος και σύζευξη αυτού με το C-τελικό αμινοξύ και ε) στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές.

Για στερεό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ένα πολυμερές που φέρει δραστική ομάδα τύπου μεθυλενοχλωριδίου (υποκατάστασης 0,32 meq/gr, ρητίνης χλωρομεθυλιωμένης με 1% διβινυλοβενζόλιο, DTB). Η προσκόλληση του N-προστατευμένου-C-τελικού αμινοξέος πάνω στη ρητίνη έγινε μέσω μιας συνολικής εστεροποίησης. Η χλωρομεθυλιωμένη ρητίνη με 1% DTB αντέδρασε με το άλας του καισίου του N-προστατευμένου αμινοξέος γρήγορα, με σχηματισμό ενός N-προστατευμένου αμινο-ακυλο-εστέρα ρητίνης χωρίς παραπροϊόντα. Η πορεία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής στάδια<sup>122</sup>.

A) Προστασία της α-αμινομάδας του C-τελικού αμινοξέος (π.χ. BOC-AA).



Β) Μετατροπή του Ν-προστατευμένου αμινοξέος σε άλας του καϊσίου (π.χ. BOC-AAO<sup>-</sup> Cs<sup>+</sup>).

Γ) Προσκόλληση του υπό μορφή άλατος του καϊσίου αμινοξέος πάνω στη χλωρομεθυλιωμένη ρητίνη παρουσία άνυδρου DMF (π.χ. BOC-AA-R).

Δ) Προσδιορισμός της υποκατάστασης της ρητίνης (τιτλοδότηση ρητίνης) με τη βοήθεια του πικρικού οξέος<sup>123</sup>.

Η τιτλοδότηση της ρητίνης έγινε με διάλυμα πικρικού οξέος το οποίο σχηματίζει άλας με την αμινομάδα του προσκολλημένου αμινοξέος. Μετά απο προσεκτική έκπλυση προς αφαίρεση της περίσσειας του πικρικού, η ρητίνη κατεργάσθηκε με ισχυρή βάση η οποία ελευθερώνει ποσοτικά το πικρικό οξύ από το πολυμερές. Η συγκέντρωση του πικρικού στο διάλυμα προσδιορίσθηκε φασματοφωτομετρικά και εκφράζει την υποκατάσταση της ρητίνης.

Αναλυτικά η πορεία που ακολουθήθηκε για την τιτλοδότηση της ρητίνης είναι η εξής:

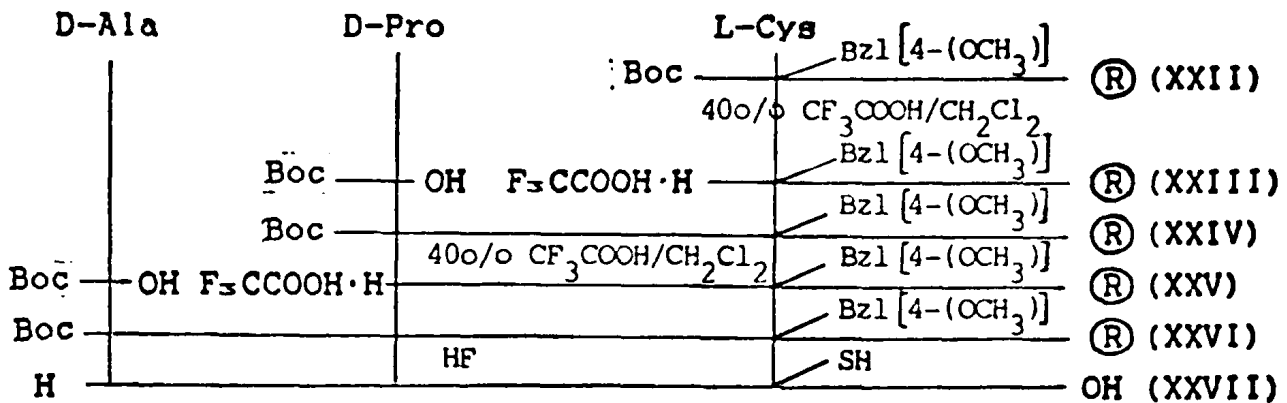
- 1) Αντίδραση δύο φορές με 40% διάλυμα τριφθοροξικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο, την πρώτη φορά επί 5 λεπτά και τη δεύτερη επί 10 λεπτά της ώρας.
- 2) Εκπλυση με διχλωρομεθάνιο, τρεις φορές επί 1 λεπτό της ώρας κάθε φορά.
- 3) Εξουδετέρωση δύο φορές, με 5% (v/v) διάλυμα δίσοπροπυλαιθυλαμίνης σε διχλωρομεθάνιο, 3 λεπτά της ώρας κάθε φορά.
- 4) Εκπλυση με διχλωρομεθάνιο, τρεις φορές επί 1 λεπτό της ώρας κάθε φορά.
- 5) Αντίδραση δύο φορές με 0,1 Μ πικρικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο, 3 λεπτά της ώρας κάθε φορά.
- 6) Εκπλυση με διχλωρομεθάνιο, πέντε φορές επί 2 λεπτά της ώρας κάθε φορά.
- 7) Αντίδραση δύο φορές, με 5% (v/v) διάλυμα δίσοπροπυλαιθυλαμίνης σε διχλωρομεθάνιο, 3 λεπτά της ώρας κάθε φορά.
- 8) Εκπλυση με διχλωρομεθάνιο, τρεις φορές επί 2 λεπτά της ώρας
- 9) Συμπύκνωση του διαλύματος μέχρι πολύ μικρού όγκου και αραίωση αυτού μέχρις όγκου 50 ml με 95% αιθανόλη.
- 10) Καταγραφή του ηλεκτρονικού φάσματος UV στη περιοχή: 320-400 nm.



Όλα τα αμινοξέα συζεύχθηκαν ως N<sup>o</sup>-tert-βουτυλοξυκαρβονυλοπαράγωγα, ενώ η παράπλευρη δραστική ομάδα της κυστεΐνης προστατεύτηκε από την p-μεθυξυβενζυλομάδα και της σερίνης με την βενζυλομάδα. Σαν αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο σε διάλυμα διχλωρομεθανίου. Η συμπλήρωση των αντιδράσεων σύζευξης επιβεβαιώνονταν κάθε φορά με την αντίδραση νινυδρίνης (τεστ Kaiser). Τα πεπτιδία αποσπάσθηκαν από το πολυμερές με την επίδραση 10 ml διασπασταγμένου υδροφθορίου ανά 1 gr πολυμερούς-πεπτιδίου επί 1 ώρα στους 0° C παρουσία φαινόλης και ανισόλης.

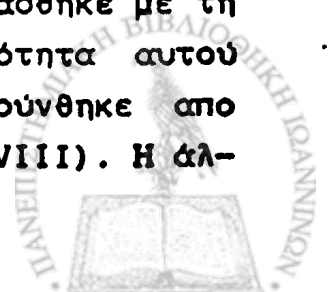
Μετά την επίδραση του υδροφθορίου, απομακρύνθηκαν με αιθερικές πλύσεις από το μίγμα το μεγαλύτερο μέρος των ανεπιθύμητων προσμεξεων και στη συνέχεια η ουσία διαλύθηκε σε διάλυμα 2N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώθηκε το αντίστοιχο πεπτιδίο.

Στη συνέχεια περιγράφεται η πορεία της σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Cys (XXVII) η οποία διαγραμματικά φαίνεται στο σχήμα 48.



**Σχήμα 48.** Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Cys.

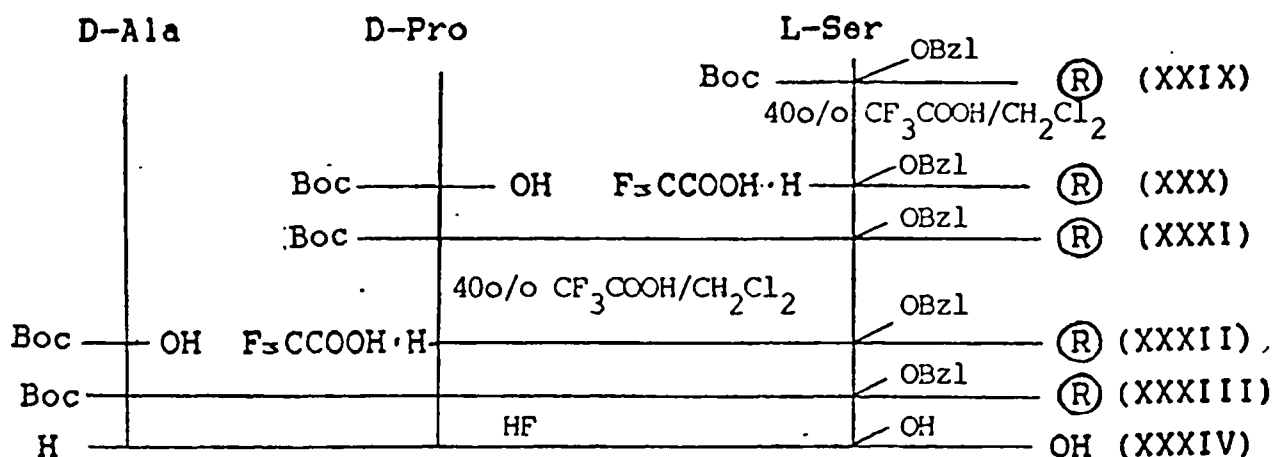
Ο διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλοκυστεΐνης (XXIV) παρασκευάσθηκε με τη μέθοδο του δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου. Η μισή ποσότητα αυτού εφυλάχθη σαν διπεπτιδίο το οποίο στο τέλος απομακρύνθηκε από το πολυμερές με επίδραση υδροφθορίου στους 0° C (XXVIII). Η άλ-



λη μισή ποσότητα του διπεπτιδίου (XXIV) μετατράπηκε στο αντίστοιχο τριφθοροξικό άλας (XXV) με επίδραση 40% τριφθοροξικού σε διάλυμα διχλωρομεθανίου.

Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης με το διπεπτιδίο (XXV) έδωσε τον διβινυλο-πολυστερεν-εστέρα της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXVI). Με επίδραση διασπασταχμένου υδροφθορίου για 1-h στους 0°C ελήφθη το ελεύθερο πεπτιδίο (XXVII).

Η πορεία της σύνθεσης του πεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Ser (XXXIV) περιγράφεται παρακάτω (σχ.49).

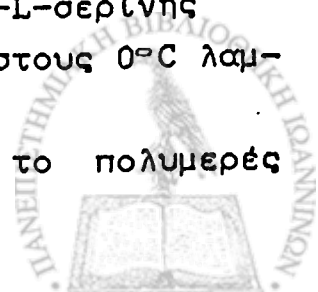


**Σχήμα 49.** Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Ser.

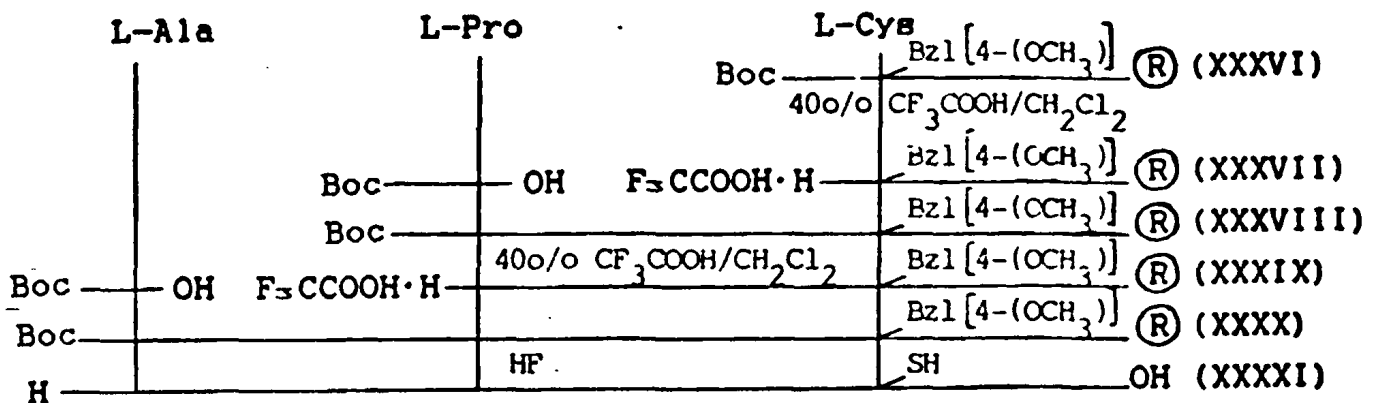
Ο διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-O-βενζυλο-L-σερίνης (XXXI) παρασκευάσθηκε με τη μέθοδο του δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου. Με επίδραση 40% τριφθοροξικού σε διχλωρομεθάνιο το (XXXI) έδωσε το αντίστοιχο τριφθοροξικό άλας (XXXII).

Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης με το διπεπτιδίο (XXXII) έδωσε τον διβινυλο-πολυστερεν-εστέρα της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-O-βενζυλο-L-σερίνης (XXXIII). Μετά από επίδραση υδροφθορίου για 1 h στους 0°C λαμβάνεται ελεύθερο το τριπεπτιδίο (XXXIV).

Η απομάκρυνση του διπεπτιδίου (XXXI) από το πολυμερές έγινε όπως και του τριπεπτιδίου (XXXIV).



Η πορεία της σύνθεσης του πεπτιδίου L-Ala-L-Pro-L-Cys (XXXXI) περιγράφεται παρακάτω (σχ.50).



Σχήμα 50. Διαγραμματική πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου L-Ala-L-Pro-L-Cys.

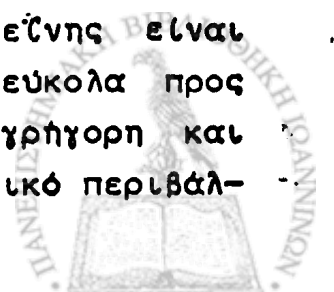
Ο διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προυλο-S-p-μεθοξυ-βενζυλο-L-κυστεΐνης (XXXVIII) παρασκευάστηκε με τη μέθοδο του δικυκλο-εξυλο-καρβοδιϊμιδίου. Με επίδραση 40% τριφθοροξικού σε διχλωρομεθάνιο το (XXXVIII) έδωσε το αντιστοιχο άλας (XXXIX).

Σύζευξη της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανίνης με το διπεπτιδιο (XXXIX) έδωσε τον διβινυλο-πολυστερεν-εστέρα της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXXX). Με επίδραση δισαποσταγμένου υδροφθορλου για 1h στους 0°C ελήφθη το ελεύθερο πεπτιδιο (XXXXI).

Η απομάκρυνση του διπεπτιδίου (XXXVIII) απο το πολυμερές καθώς και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων έγινε όπως και στο τριπεπτιδιο (XXXXI).

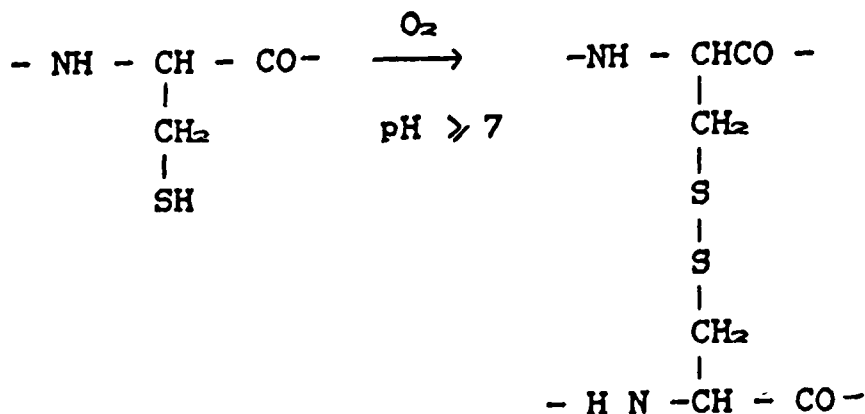
### IX.2. Προσδιορισμός -SH ομάδων κυστεΐνης

Όπως είναι γνωστό η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης είναι μια πολύ δραστική ομάδα, η οποία οξειδώνεται πολύ εύκολα προς σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Η οξειδωση είναι γρήγορη και γίνεται με απλή διαβίβαση αέρα σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλ-

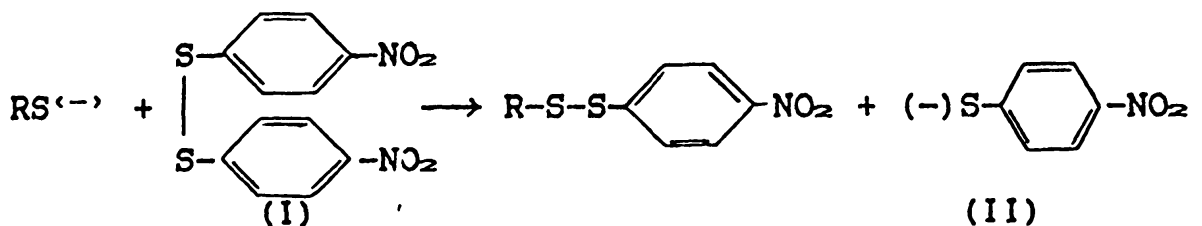




λον.



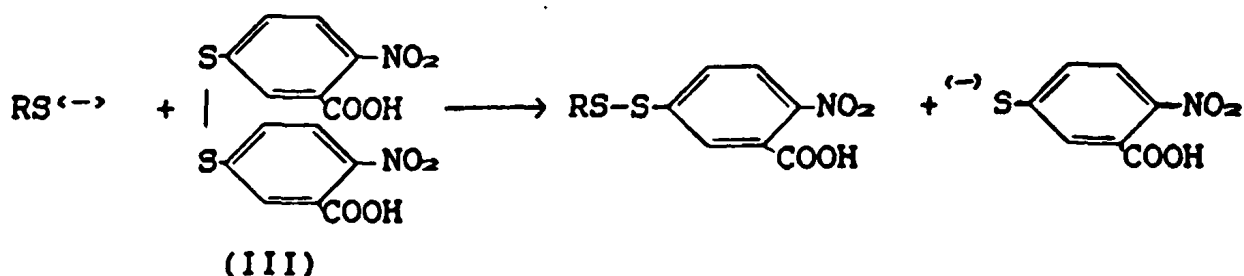
Ο Ellman το 1958<sup>124</sup> παρουσίασε μια γρήγορη και εύκολη μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης της ελεύθερης -SH ομάδας των σουλφυδρυλοενώσεων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αντίδραση του δι(4-νιτροφαινυλο)δισουλφιδίου (I) με παράγωγα αλειφατικών θειοενώσεων σε pH=7,5 δίνοντας ένα γραμμοίον p-νιτροθειοφαινόλης (II) ανα γραμμομόριο θειοένωσης. Το ανιόν αυτό εμφανίζει έντονο κίτρινο χρώμα (Em = 13.600 στο 412 nm) και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό τη συγκέντρωσης της ελεύθερης σουλφυδρυλομάδας.



Το δισουλφίδιο (I) είναι αδιάλυτο στο νερό και γι'αυτό χρησιμοποιείται σαν διαλύτης υδατικό διάλυμα ακετόνης. Η χρησιμοποίηση όμως της ακετόνης έχει ορισμένα μειονεκτήματα όπως, η καταβύθιση ή μετουσίωση των πρωτεϊνών, η διαφορετική ταχύτητα αντίδρασης μεταξύ διαφορετικών σουλφυδρυλοενώσεων κλπ.

Γι'αυτούς τους λόγους ο Ellman το 1959<sup>125</sup> πρότεινε μια τροποποίηση της προαναφερθείσας μεθόδου σύμφωνα με την οποία αντικατέστησε το δισουλφίδιο (I) από το υδατοδιαλυτό δισουλφίδιο δι(3-καρβοξυ-4-νιτροφαινυλο)δισουλφίδιο (III) (DTNB).





Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η προσθήκη μικρού όγκου (0,05 ml) αντιδραστήριου Ellman, σε μια σειρά από μεγαλύτερους όγκους ρυθμιστικών διαλυμάτων (pH=7,5) της σουλφυδρυλοένωσης, διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Γι' αυτό το σκοπό παρασκευάσθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα όξινων και δισόξινων φωσφορικών (pH=7,5) ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
2. Αντιδραστήριο Ellman: Διάλυμα 0,01M DTNB σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7,5 φωσφορικών; και
3. Διάλυμα του αναστολέα που περιέχει κυστεΐνη σε διάλυμα φωσφορικών pH=7,5.

Σε μια σειρά από πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια, με την εξής σειρά:

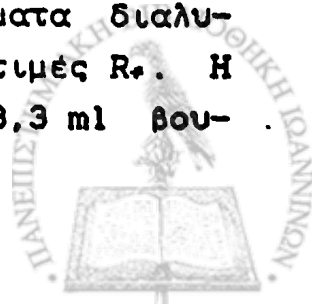
- α) 4 ml του ρυθμιστικού  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- β) 0, 0.01, 0.02, 0.03 και 0.04 ml διαλύματος κυστεΐνο-πεπτιδίου αντίστοιχα στους σωλήνες 1,2,3,4 και 5.
- γ) 0,05 ml διαλύματος DTNB.

Μετά από 10 λεπτά της ώρας μετρήθηκε η απορρόφηση  $\lambda$  των διαλυμάτων σε μήκος κύματος  $\lambda=412$  nm, χρησιμοποιώντας το δείγμα που δεν περιέχει καθόλου πεπτιδίο σαν αναφορά.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία όγκου 3 ml και μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm.

### IX.3. Σύνθεση πεπτιδικών αναστολέων

Οι χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας έγιναν σε πλάκες Silica gel και χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστήματα διαλυτών, στα οποία αναφέρονται και οι αναγραφόμενες τιμές  $R_f$ . Η εμφάνιση έγινε με νινυδρίνη (0.1 gr νινυδρίνη σε 33,3 ml βουτανόλης και 1 ml οξικού οξέος).



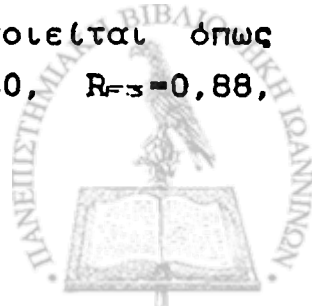
1. Μεθανόλη: οξικός αιθυλεστέρας (1:2 V/V)
2. Ακετονιτρίλιο: βενζόλιο (1:1 V/V)
3. Χλωροφόρμιο: τετραχλωράνθρακας: μεθανόλη (6:3:1 V/V)
4. Μεθανόλη: χλωροφόρμιο (1:2 V/V)
5. Μεθανόλη: χλωροφόρμιο (1:1 V/V)
6. κ.βουτανόλη: οξικό οξύ: νερό (4:1:5 V/V)
7. κ.βουτανόλη: πυριδίνη: οξικό οξύ 0.1% (5:3:11 V/V)
8. κ.βουτανόλη: οξικό οξύ: νερό (4:1:1 V/V)
9. Προπανόλη: οξικό οξύ: νερό (7:1:2 V/V)

Σε όλες τις πεπτιδικές συνθέσεις χρησιμοποιήθηκαν άνυδρα διαλυτικά μέσα. Τα N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D (ή L)-αμινοξέα, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο του Schnabel<sup>124</sup>.

Όλα τα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα χαρακτηρίστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και NMR φασματοσκοπικές αναλύσεις.

#### N-t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-άσπαραχινοδιβενζυλεστέρας(I

0.24 gr (1,1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλίνης διαλύονται σε 3 ml απόλυτου τετραϋδροφουράνιου, το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  και προστίθενται 0,11 ml (1,1 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,15 ml (1,1 mM) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 5' και στη συνέχεια προστίθενται 0,49 gr (1 mmol) p-τολουολοσουλφονικού-L-άσπαραχινοδιβενζυλεστέρα σε 3 ml ψυχρού τετραϋδροφουράνιου και 0.14 ml (1 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH= 7). Το διάλυμα παραμένει στους  $0^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό, 1 M όξινο θειικό νάτριο, νερό, 1 M όξινο άνθρακικό νάτριο και νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα μετά ξήρανση με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνεται και χρησιμοποιείται όπως είναι. Απόδοση 0,35 gr (0.69 mmol) (69%)  $R_{F1}=0,80$ ,  $R_{F2}=0,88$ ,  $R_{F3}=0,88$ ,  $R_{F4}=0,73$ .



Υδροχλωρικός D-προλυλο-L-ασπαραχινοδιβενζυλεστέρας (II)

0,51gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-ασπαραχινοδιβενζυλεστέρα (I) διαλύονται σε 3-4 ml άνυδρου υδροχλωρίου σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται μερικές φορές με διάφορα μίγματα όπως αιθέρα-πετρελαϊκού, αιθέρα-εξανίου, αιθέρα-δίσσο-προπυλαιθέρα, τελικά δεν κρυσταλλώνει και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Απόδοση 0,44 gr (0,98 mmol) (98%).

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραχινοδιβενζυλεστέρας (III)

0,42gr (2,2 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης διαλύονται σε 5 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου, το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  και προστίθενται 0,22ml (2,2 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,3 ml (2,2 mM) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 5', οπότε προστίθενται 0,89 gr (2 mmol) υδροχλωρικού-D-προλυλο-L-ασπαραχινοδιβενζυλεστέρα (II) σε 5 ml ψυχρού τετραϋδροφουρανίου και 0,28 ml (2 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH=7). Το διάλυμα παραμένει στους  $0^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό, 1 M όξινο θειικό νάτριο, νερό, 1 M όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα μετά ξήρανση με άνυδρο θειικό νάτριο συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνεται παρά τις προσπάθειες που έγιναν με διάφορα συστήματα όπως αιθέρας-πετρελαϊκός, αιθέρας-εξάνιο  $R_{F1}=0,85$   $R_{F3}=0,86$   $R_{F4}=0,90$   $R_{F7}=0,91$  Απόδοση 0,86 gr (1,48 mmol) (74%).

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραχινικό οξύ (IV)

0,86 gr (1,48 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-



προλυλο-L-ασπαραγινοδιβενζυλεστέρα (III) διαλύονται σε μίγμα που αποτελείται από 17 ml μεθανόλης, 1 ml νερού και 8 σταγόνες οξικού οξέος. Επίσης προστίθεται 0,15 gr άνθρακα που περιέχει 10% προσροφημένο παλλάδιο και στο μίγμα διαβιβάζεται υδρογόνο με τη βοήθεια ειδικής συσκευής. Μετά μια νύκτα το μίγμα διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνει και χρησιμοποιείται όπως είναι.  $R_{Fz}=0,70$ ,  $R_{Fs}=0,78$ . Απόδοση 0,49 gr (1,22 mmol) (82,4%).

Υδροχλωρικό άλας του D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγινικού οξέ-  
ος (V)

0,49 gr (1,22 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (IV) διαλύονται σε 3-4 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα όπως αιθέρα-εξανίου, αιθέρα-πετρελαϊκού, αλλά δεν κρυσταλλώνει. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια η ουσία διαλύεται σε διάλυμα 2 N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώθηκε σε στερεά κατάσταση το πεπτίδιο (V).  $R_{Fz}=0$ ,  $R_{F7}=0,12$ ,  $R_{F8}=0,10$ ,  $R_{F9}=0,30$ . Απόδοση 0,34 gr (1 mmol) (81,97%).

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (VI)

0,96 gr (1,88 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγινοδιβενζυλεστέρα (II) διαλύονται σε μίγμα που αποτελείται από 18 ml μεθανόλης, 1 ml νερού και 10 σταγόνες οξικού οξέος. Επίσης προστίθεται 0,15 gr άνθρακα που περιέχει 10% προσροφημένο παλλάδιο και στο μίγμα διαβιβάζεται υδρογόνο μέσω ειδικής συσκευής. Μετά μια νύκτα το μίγμα διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνεται και χρησιμοποιείται όπως είναι. Απόδοση 0,50 gr (1,50 mmol).



Υδροχλωρικό άλας του D-προλυλο-L-ασπαραγινικού οξέος (VII)

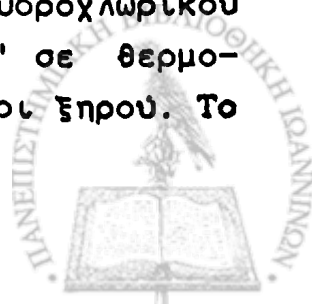
0,50 gr (1,50 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (VI) διαλύονται σε 3-4ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα όπως αιθέρα-εξανίου, αιθέρα-πετρελαϊκού, αλλά δεν κρυσταλλώνει. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια η ουσία διαλύεται σε διάλυμα 2N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώθηκε το πεπτιδίο (VII).  $R_{f1}=0$ ,  $R_{f2}=0,14$ ,  $R_{f3}=0,13$ ,  $R_{f4}=0,25$ , Απόδοση 0,34 gr (1,28 mmol) (85,33%).

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-γλυκινομεθυλεστέρας (VIII)

0,24gr (1,1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλίνης διαλύονται σε 3 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου, το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  και προστίθενται 0,11 ml (1.1 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,15 ml (1,1 mmol) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 5' και στη συνέχεια προστίθενται 0,12 gr (1 mmol) υδροχλωρικού γλυκινομεθυλεστέρα σε 3 ml ψυχρού τετραϋδροφουρανίου και 0,14 ml (1 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH=7). Το διάλυμα παραμένει στους  $0^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό, 1 M όξινο θειϊκό νάτριο, νερό, 1 M όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα μετά ξήρανση με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα κρυσταλλώνεται από άνυδρο αιθέρα. Απόδοση 0,20 gr (68%)  $R_{f1}=0,73$   $R_{f2}=0,64$ .

Υδροχλωρικός-D-προλυλο-γλυκινομεθυλεστέρας (IX)

0,29gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλογλυκινομεθυλεστέρα (VIII) διαλύονται σε 2-3 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το



ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με άνυδρο αιθέρα απ'όπου και κρυσταλλώνεται  $R_{\alpha} = 0,19$ ;  $R_{\beta} = 0,05$ .

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλοχλυκινομεθυλεστέρας (X)

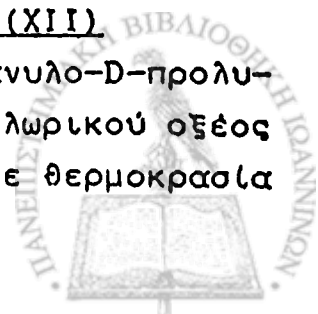
0,42gr (2,2 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης διαλύονται σε 5 ml απόλυτου τετραϋδροφουρανίου, το διάλυμα ψύχεται στους  $-17^{\circ}\text{C}$  και προστίθενται 0,22 ml (2,2 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,3 ml (2,2 mmol) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους  $-17^{\circ}\text{C}$  για 5', οπότε προστίθενται 0,45 gr (2 mmol) υδροχλωρικού-D-προλυλοχλυκινομεθυλεστέρα (IX) σε 5 ml τετραϋδροφουρανίου και 0,28 ml (2 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH=7). Το διάλυμα παραμένει στους  $0^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό, 1 M όξινο θειικό νάτριο, νερό, 1 M όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα μετά ξήρανση με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνεται και χρησιμοποιείται όπως είναι  $R_{\alpha} = 0,7$   $R_{\beta} = 0,61$ . Απόδοση 0,57 gr (1,58 mmol) (79%).

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλοχλυκίνη (XI)

0,36gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλοχλυκινομεθυλεστέρα (X) διαλύονται σε 7 ml διοξάνης και προστίθενται 1,35 ml νερού και 1,35 ml 2N διαλύματος καυστικού νατρίου. Το διάλυμα αναδεύεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με νερό και οξινίζεται στους  $0^{\circ}\text{C}$  με 1M όξινο θειικό νάτριο μέχρι pH=3. Ακολούθως εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα ξηραίνεται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα κρυσταλλώνεται από άνυδρο αιθέρα. Απόδοση 0,23 gr (65%).

Υδροχλωρικό άλας της D-αλανυλο-D-προλυλοχλυκίνης (XII)

0,34 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλοχλυκίνη (XI) διαλύονται σε 2-3 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία



δωματιου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα όπως αιθέρα-εξανίλου, αιθέρα-διίσοπροπυλαιθέρα αλλά δεν κρυσταλλώνει. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια διαλύεται σε διάλυμα 2 N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώθηκε σε ελαιώδη κατάσταση το πεπτιδίο (XII). Απόδοση 0,25 gr (0,92 mmol) (92%),  $R_{F_1}=0$   $R_{F_2}=0,17$   $R_{F_3}=0,10$   $R_{F_4}=0,23$ .

#### N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλογλυκίνη (XIII)

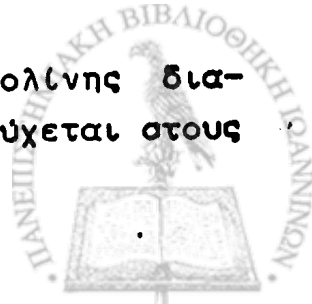
0,28gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-γλυκινομεθυλεστέρα (VIII) διαλύονται σε 7 ml διοξάνης και προστίθενται 1,35 ml νερού και 1,35 ml 2N διαλύματος καυστικού νατρίου. Το διάλυμα αναδεύεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματιου, αραιώνεται με νερό και οξινίζεται στους 0°C με 1M όξινο θειϊκό νάτριο μέχρι pH=3. Ακολούθως εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα ξηραίνεται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα κρυσταλλώνει απο άνυδρο αιθέρα. Απόδοση 0,19 gr (0,7 mmol) (70%)  $R_{F_1}=0,6$   $R_{F_2}=0,3$ .

#### Υδροχλωρικό άλας της D-προλυλο-γλυκίνης (XIV)

0,27 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-γλυκίνη (XIII) διαλύονται σε 2-3 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματιου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα όπως αιθέρα-εξανίλου, αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα, αλλά δεν κρυσταλλώνει. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια διαλύεται σε διάλυμα 2 N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος η ουσία απομονώθηκε σε ελαιώδη πάλι κατάσταση. Απόδοση 0,19 gr (90%)  $R_{F_1}=0,08$   $R_{F_2}=0,10$   $R_{F_3}=0,16$ .

#### N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρας (XV)

0,24 gr (1,1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλίνης διαλύονται σε 3 ml τετραϋδροφουρανίου, το διάλυμα ψύχεται στους





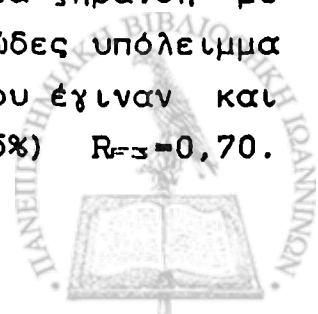
-17°C και προστίθενται 0,11 ml (1,1 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,15 ml (1,1 mmol) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους -17°C για 5', οπότε προστίθενται 0,20 gr (1mmol) L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρα σε 3 ml ψυχρού τετραϋδροφουράνιου και 0,14 ml (1 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH=7). Το διάλυμα παραμένει στους 0°C για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κρυσταλλώνεται απο άνυδρο αιθέρα. Απόδοση 0,24 gr (0,67 mmol) (67%)  $R_{F1}=0,55$   $R_{F2}=0,76$ .

Υδροχλωρικός L-προλυλο-L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρας (XVI)

0,36 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρα (XV) διαλύονται σε 2-3 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κρυσταλλώνεται απο μίγμα μεθανόλης με σταγόνες νερού. Απόδοση 0,28 gr (0,95 mmol) (95%).  $R_{F1}=0,01$ ,  $R_{F2}=0,02$ .

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρας (XVII)

0,42 gr (2,2 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανίνης διαλύονται σε 5 ml απόλυτου τετραϋδροφουράνιου, το διάλυμα ψύχεται στους -17°C και προστίθενται 0,22 ml (2,2 mmol) N-μεθυλομορφολίνης και 0,3 ml (2,2 mmol) χλωρομυρμηκικού ισοβουτυλεστέρα. Το διάλυμα παραμένει στους -17°C για 5' οπότε προστίθενται 0,59 gr (2 mmol) υδροχλωρικού-L-προλυλο-L-ασπαραχινοδιμεθυλεστέρα (XVI) σε 5 ml ψυχρού τετραϋδροφουράνιου και 0,28 ml (2 mmol) τριαιθυλαμίνης (pH=7). Το διάλυμα παραμένει στους 0°C για μια ώρα και μετά μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό, 1M όξινο θειϊκό νάτριο, νερό, 1M όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα μετά ξήρανση με άνυδρο  $Na_2SO_4$  συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνει παρά τις έντονες προσπάθειες που έγιναν και χρησιμοποιείται όπως είναι. Απόδοση 0,64 gr (0,75%)  $R_{F1}=0,70$ .



N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (XVIII)

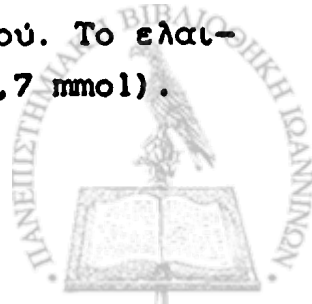
0,43 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινοδιμεθυλεστερα (XVII) διαλύονται σε 7 ml διοξάνης και προστίθενται 1,35 ml νερού και 1,35 ml 2 N διαλύματος καυστικού νατρίου. Το διάλυμα αναδεύεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με νερό και οξινίζεται στους 0°C με 1 M όξινο θειικό νάτριο μέχρι pH=3. Ακολούθως εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα ξηραίνεται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνεται και γι' αυτό χρησιμοποιείται όπως είναι. Απόδοση 0,26 gr (0,65 mmol) (65%)  $R_{F6}=0,60$ .

Υδροχλωρικό άλας του L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινικού οξέος (XIX)

0,4 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινικού οξέος (XVIII) διαλύονται σε 3-4 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα διαλυτών αλλά δεν κρυσταλλώνεται. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια η ουσία διαλύεται σε διάλυμα 2 N οξικού οξέος. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώθηκε το πεπτιδιο (XIX) σε μορφή "μαστίχας". Απόδοση 0,255 gr (0,76 mmol) (76%)  $R_{F6}=0$ ,  $R_{F7}=0,11$   $R_{F8}=0,12$   $R_{F9}=0,28$ .

N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινικό οξύ (XX)

0,36 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραγινοδιμεθυλεστέρα (XV) διαλύονται σε 7 ml διοξάνης και προστίθενται 1,35 ml νερού και 1,35 ml 2 N διαλύματος καυστικού νατρίου. Το διάλυμα αναδεύεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με νερό και οξινίζεται στους 0°C με 1M όξινο θειικό νάτριο μέχρι pH=3. Ακολούθως εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό. Η στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα ξηραίνεται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα δεν κρυσταλλώνει. Απόδοση 0,24 gr (0,7 mmol).



Υδροχλωρικό άλας του L-προλυλο-L-ασπαραχινικού οξέος (XXI)

0,33 gr (1 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-προλυλο-L-ασπαραχινικού οξέος (XX) διαλύονται σε 3-4 ml άνυδρου υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη 4N. Το διάλυμα αναδεύεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διάφορα μίγματα διαλυτών αλλά δεν κρυσταλλώνεται. Συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια η ουσία διαλύεται σε διάλυμα 2N οξικού οξέος. Με λυοφιλοποίηση του διαλύματος απομονώθηκε το πεπτίδιο (XXI) σε μορφή "μαστιχας". Απόδοση 0,24 gr (0,9 mmol) (90%).  $R_{f\alpha} = 0,30$ ,  $R_{f\beta} = 0,12$ ,  $R_{f\gamma} = 0,17$ .

Διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-S-p-μεθοξυ-βενζυλο-L-κυστεΐνης (XXII)

1,5 gr (3 mmol) άλας του καϊσίου της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης διαλύονται σε 48 ml άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου και προστίθενται 6 gr (1,92 mgCl) χλωρομεθυλιωμένης ρητίνης. Το διάλυμα παραμένει για 24 ώρες στους 50°C, διηθείται και εκπλένεται με διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοφορμαμίδιο : νερό (9:1 V/V), διμεθυλοφορμαμίδιο και αιθανόλη. Απόδοση 6,87 gr, (1,62 mmol).

Διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXIV)

6,87 gr (1,62 mmol) διβινυλο-πολυστερεν-εστέρα της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXII) εκπλένονται με:

3 X 1'		διχλωρομεθάνιο
3 X 1'		μεθανόλη
3 X 1'		διχλωρομεθάνιο
1 X 5'	40%	τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο
1 X 10'	40%	τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο
3 X 1'		διχλωρομεθάνιο
2 X 2'	10%	τριαιθυλαμίνη σε διχλωρομεθάνιο
3 X 1'		διχλωρομεθάνιο
3 X 1'		μεθανόλη
3 X 1'		διχλωρομεθάνιο



Προστίθενται 1,05 gr (4,88 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλίνης σε 4 ml διχλωρομεθάνιου και 1 gr (4,88 mmol) δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου σε 4 ml διχλωρομεθάνιου. Το μίγμα παραμένει υπό ανάδευση για μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένεται με

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

3 X 1' μεθανόλη

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

Ακολουθεί τέρστ Caiser που υποδηλώνει ότι η σύζευξη έχει πραγματοποιηθεί και το στερεό λαμβάνεται με τη βοήθεια μεθανόλης προς ξήρανση. Απόδοση 7.55 gr.

Διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλα-  
νυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXVI)

3,5 gr (0,82 mmol) διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXIV) εκπλένεται με:

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

3 X 1' μεθανόλη

1 X 5' 40% τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο

1 X 10' 40% τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

2 X 2' 10% τριαιθυλαμίνη σε διχλωρομεθάνιο

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

3 X 1' μεθάνιο

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

Προστίθενται 0,47gr (2,46 mmol) N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανίνης σε 3 ml διχλωρομεθάνιου και 0,51 gr (2,46 mmol) δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου σε 3 ml διχλωρομεθάνιου. Το μίγμα παραμένει υπό ανάδευση για μια νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένεται με

3 X 1' διχλωρομεθάνιο

3 X 1' μεθανόλη

3 X 1' διχλωρομεθάνιο



Ακολουθεί τέστ Caiser που υποδηλώνει ότι η σύζευξη έχει πραγματοποιηθεί και η στερεά ουσία λαμβάνεται με τη βοήθεια μεθάνολης προς ξήρανση. Απόδοση 4,21 gr.

Οξικό άλας της D-αλανυλο-D-προλυλο-L-κυστεΐνης (XXVII)

Σε 4,21 gr (0,99 mmol) διβινυλο-πολυστερεν-εστέρα της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-αλανυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXVI) προστίθενται 2,11gr (22,4 mmol) φαινόλης και 4,2 ml ανισόλης. Με τη βοήθεια ειδικής συσκευής διαβιβάζονται 40 ml δισοποσταγμένου υδροφθορικού για 1 ώρα στους 0°C. Το μίγμα εκπλένεται με αιθέρα και η ουσία παραλαμβάνεται με διάλυμα οξικού οξέος 2 N. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώνεται το πεπτιδίο. Απόδοση 0,15 gr (0,53 mmol) (66,7%).  $R_f = 0,10$

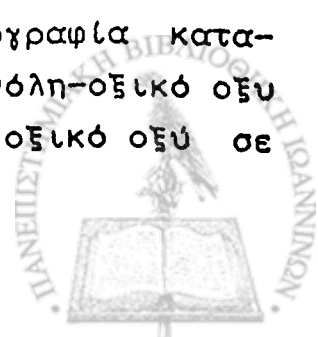
Οξικό άλας της D-προλυλο-L-κυστεΐνης (XXVIII)

Σε 3,12 gr (0,73 mmol) διβινυλο-πολυστερεν-εστέρας της N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-D-προλυλο-S-p-μεθοξυβενζυλο-L-κυστεΐνης (XXI) προστίθενται 1,56gr (16,59mmol) φαινόλης και 3,2 ml ανισόλης. Με τη βοήθεια ειδικής συσκευής διαβιβάζονται 32 ml δισοποσταγμένου υδροφθορικού για 1 h στους 0°C. Το μίγμα εκπλένεται με αιθέρα και η ουσία παραλαμβάνεται με διάλυμα οξικού οξέος 2 N. Με λυοφιλιποίηση του διαλύματος απομονώνεται το πεπτιδίο. Απόδοση 0,11 gr (0,5 mmol) (68,5%).  $R_f = 0,33$ ,  $R_{f2} = 0,10$ .

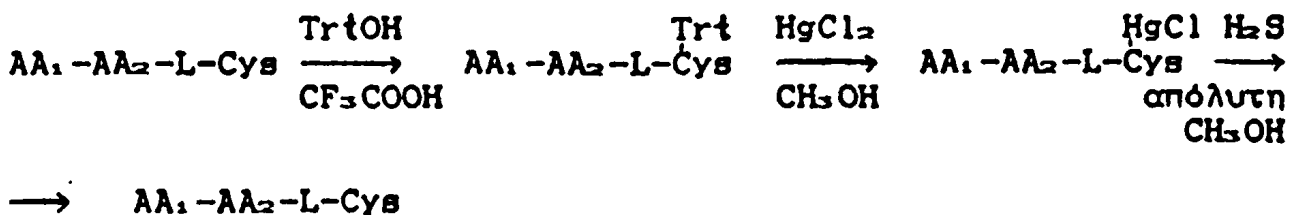
Αντιστοίχα ακριβώς πειράματα έγιναν και για τη σύνθεση σε στερεά φάση των άλλων πεπτιδίων: L-Ala-L-Pro-L-Cys, L-Pro-L-Cys, D-Ala-D-Pro-L-Ser και D-Pro-L-Ser.

Καθαρισμός πεπτιδίων

Όλα τα τελικά πεπτιδία, εκτός αυτών που περιέχουν κυστεΐνη υποβλήθηκαν σε εκτενή καθαρισμό με χρωματογραφία κατανομής σε Sephadex G-25 με υγρά ανάπτυξης n-βουτανόλη-οξικό οξύ-νερό (4:1:5 V/V) και n-βουτανόλη-πυριδίνη-0.1% οξικό οξύ σε νερό (5:3:11 V/V).



Ο καθαρισμός των πεπτιδίων της κυστεΐνης έγινε με παροδική τριτυλίωση και αποτριτυλίωση της σουλφυδρυλομάδας ώστε να απομακρυνθούν οι οξειδωμένες μορφές<sup>127</sup>:



όπου AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub> = D-Ala, D-Pro και L-Ala, L-Pro

#### D-αλανυλο-D-προλυλο-S-τριτυλο-L-κυστεΐνη

Σε 0,123gr (0,425 mmol) οξικού αλάτος της D-αλανυλο-D-προλυλο-L-κυστεΐνης (XXVII) προστίθενται 0,122 gr (0,47 mmol) τριφαινυλομεθανόλης και 1 ml τριφθοροξικού οξέος. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 15' και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κρυσταλλώνεται από αιθέρα. Απόδοση 0,13 gr (0,24 mmol) (56,6%).

#### D-αλανυλο-D-προλυλο-S-χλωριούχου υδραργύρου-L-κυστεΐνη

Σε 0,13 gr (0,24 mmol) D-αλανυλο-D-προλυλο-S-τριτυλο-L-κυστεΐνης προστίθενται 20 ml απόλυτης μεθανόλης και 0,13 gr (0,48 mmol) χλωριούχου υδραργύρου II. Το μίγμα αφήνεται για 20' στους 25°C και εν συνεχεία προστίθεται αιθέρας και διηθείται. Απόδοση 0,11 gr (0,21 mmol) (85%).

#### D-αλανυλο-D-προλυλο-L-κυστεΐνη

0,11 gr (0,21 mmol) D-αλανυλο-D-προλυλο-S-χλωριούχου υδραργύρου-L-κυστεΐνης διαλύονται σε 30 ml απόλυτης μεθανόλης και στο διάλυμα διαβιβάζεται υδρόθειο για 1 ώρα. Το μίγμα φυγοκεντρείται και το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες υπόλειμμα κρυσταλλώνει από αιθέρα. Απόδοση 0,055 gr (0,19 mmol) (95%).

Αντίστοιχα πειράματα έγιναν για τον καθαρισμό και των άλλων πεπτιδίων της "Cys".

Στον επόμενο πίνακα αναφέρονται όλα τα τελικά πεπτιδία με ορισμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά τους δεδομένα.



Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά αναλυτικά δεδομένα των τελικών προϊόντων.

Πενταβιο	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος	Συνολική απόδοση
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Ala-D-Pro-L-Asp}$	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3^+\text{Cl}^-$	336,5	30,5%
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Pro-L-Asp}$	$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_2^+\text{Cl}^-$	266,5	32%
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Ala-D-Pro-L-Gly}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3^+\text{Cl}^-$	278,5	22%
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Pro-L-Gly}$	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2^+\text{Cl}^-$	208,5	23%
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-L-Ala-L-Pro-L-Asp}$	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3^+\text{Cl}^-$	336,5	27%
$\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-L-Pro-L-Asp}$	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_2^+\text{Cl}^-$	266,5	29%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Ala-D-Pro-L-Cys}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{S}_1\text{O}_6\text{N}_3^+$	349,0	27%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Pro-L-Cys}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{S}_1\text{O}_5\text{N}_2^+$	277,0	28%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Ala-D-Pro-L-Ser}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{N}_3^+$	332,0	28%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-D-Pro-L-Ser}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2^+$	262,0	24%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-L-Ala-L-Pro-L-Cys}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{S}_1\text{O}_6\text{N}_3^+$	349,0	18%
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{H}_3\text{N}^+ \text{-L-Pro-L-Cys}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{S}_1\text{O}_5\text{N}_2^+$	277,0	22%

#### IX.4. Γενική αρχή φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού των Km και Ki της Clostridium κολλαγενάσης

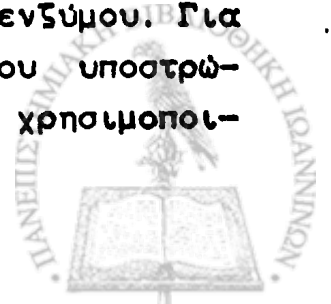
Η βασική αρχή του ποσοτικού προσδιορισμού της δραστηρότητας της κολλαγενάσης, με φουρανοκρυλοϋλο-υποκατεστημένα πεπτιδία ως υποστώματα, βασίζεται στη μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος του φάσματος απορρόφησης, που συμβαίνει λόγω της υδρόλυσης των φουρανοκρυλοϋλο-πεπτιδίων σε φουρανοκρυλοϋλο-αμινοξύ και υπόλοιπο τμήμα πεπτιδίου.

Μια ποικιλία FA-υποκατεστημένων-πεπτιδίων έχουν μελετηθεί με σκοπό να βρεθεί το βέλτιστο συνθετικό υπόστρωμα κάθε ενζύμου, π.χ. το υπόστρωμα που χαρακτηρίζεται από μεγάλη διαλυτότητα και υψηλή ειδική δραστηριότητα.

Προς αυτή την κατεύθυνση οι Van Wart και Steinbrink<sup>24</sup> έχουν κάνει αντίστοιχες μελέτες για την Clostridium κολλαγενάση και έχουν προτείνει μια πολύπλευρη συνεχή φασματοφωτομετρική τεχνική, που βασίζεται στην υδρόλυση της 2-φουρανοκρυλοϋλο-λευκυλο-γλυκυλο-προλυλο-αλανίνης (FALGPA). Η τεχνική αυτή είναι γρήγορη, εύκολη, ευαίσθητη και κατάλληλη για την απομόνωση, καθώς και για την κινητική και δομική διερεύνηση του ενζύμου.

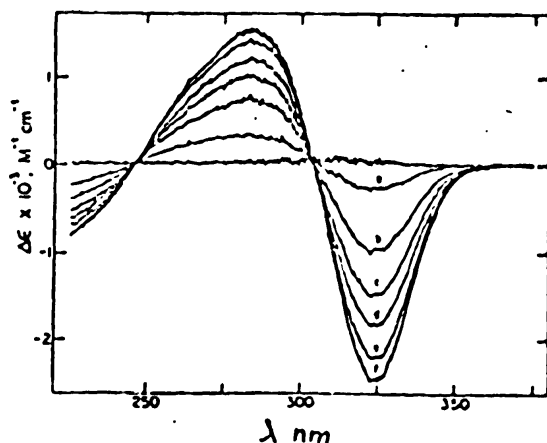
Το "FALGPA" είναι ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την κολλαγενάση λόγω του ότι υδρολύεται ταχύτερα από το ένζυμο σε σχέση με άλλα συνθετικά υποστρώματα και δεν υδρολύεται από άλλες γνωστές πρωτεΐνάσες όπως τρυψίνη, θερμολυσίνη ή ελαστάση. Το υπόστρωμα αυτό έχει μέγιστη διαλυτότητα περίπου 8 mM και ένα βέλτιστο pH=7,8. Σε μεγαλύτερες και μικρότερες τιμές του pH ο ρυθμός υδρόλυσης του υποστρώματος μειώνεται μη αντιστρεπτά με προσθήκη  $Zn^{2+}$ , γεγονός που αποδεικνύει ότι η ελάττωση της ειδικής δραστηριότητας δεν οφείλεται στην απόσπαση του  $Zn^{2+}$  από το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Προσδιορισμοί με το "FALGPA" έχουν πραγματοποιηθεί φασματοφωτομετρικά με συνεχή παρακολούθηση της πτώσης στην απορρόφηση του υποστρώματος μετά την προσθήκη του ενζύμου. Για να βρίσκεται πάντα η αρχική τιμή της απορρόφησης του υποστρώματος στην περιοχή 0,5-1,0 τα μήκη κύματος που χρησιμοποιεί-





ούνται είναι  $\lambda=324$  nm ή  $\lambda=345$  nm. Η επιλογή των τιμών αυτών του μήκους κύματος έγινε μετά απο εκτεταμένες μελέτες των Van Wart και Steinbrink, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τα εκ διαφοράς φάσματα του "FALGPA" και των λαμβανομένων απο την υδρόλυση προϊόντων, παρουσιάζουν μέγιστη τιμή του συντελεστή Δε σε μήκος κύματος  $\lambda=324$  nm (Σχ. 51).



**Σχήμα 51.** Φάσματα εκ διαφοράς του FALGPA και των λαμβανομένων απο την υδρόλυση προϊόντων σε διάφορες χρονικές στιγμές: (α) 0, (β) 6, (γ) 12, (δ) 18, (ε) 30 και (ζ) 60 min μετά την προσθήκη του ενζύμου στην κυβέττα που περιέχει το υποστρώμα.

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $V_{max}$  του συγκεκριμένου υποστρώματος παρασκευάσθηκαν μια σειρά διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tricine, 0,4 M NaCl, 10 mM  $CaCl_2$ , pH=7,5. Το ρυθμιστικό διάλυμα φυλάγεται σε κλειστή φιάλη και η τιμή του pH ελέγχεται κάθε φορά πριν απο τη χρήση του (Δεν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό πέρα από τις δέκα ημέρες). Τα διαλύματα του υποστρώματος που παρασκευάσθηκαν ήταν των παρακάτω συγκεντρώσεων:

- |                              |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| α) $0.025 \times 10^{-3} M$  | β) $0.050 \times 10^{-3} M$  | γ) $0.075 \times 10^{-3} M$  |
| δ) $0.150 \times 10^{-3} M$  | ε) $0.200 \times 10^{-3} M$  | ς) $0.250 \times 10^{-3} M$  |
| ζ) $0.300 \times 10^{-3} M$  | η) $0.350 \times 10^{-3} M$  | θ) $0.400 \times 10^{-3} M$  |
| ι) $0.450 \times 10^{-3} M$  | ια) $0.500 \times 10^{-3} M$ | ιβ) $0.550 \times 10^{-3} M$ |
| ιγ) $0.700 \times 10^{-3} M$ | ιδ) $0.800 \times 10^{-3} M$ | ιε) $1.200 \times 10^{-3} M$ |
| ις) $1.500 \times 10^{-3} M$ |                              |                              |



Όλων των παραπάνω διαλυμάτων μετρήθηκαν οι οπτικές πυκνότητες σε μήκος κύματος  $\lambda=324$  nm ή  $\lambda=345$  nm, χρησιμοποιώντας διάλυμα ρυθμιστικού ως αναφορά. Συγκεκριμένα για την περιοχή συγκεντρώσεων  $0,025 \times 10^{-3} - 0,125 \times 10^{-3} M$  μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda=324$  nm, ενώ για την περιοχή συγκεντρώσεων  $0,125 \times 10^{-3} - 2,0 \times 10^{-3} M$  μετρήθηκε η απορρόφηση σε  $\lambda=345$  nm. Σε όλα τα πειράματα η τελική συγκέντρωση ενζύμου ήταν  $4 \mu\text{gr/ml}$ .

Οι οπτικές πυκνότητες μετρήθηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο εφοδιασμένο με θερμοστατούμενες κυψελίδες στους  $22^\circ\text{C}$ . Οι κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από χαλαζία όγκου  $3 \text{ ml}$  και μήκους οπτικής διαδρομής  $1 \text{ cm}$ .

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές μελέτες αναστολής όλων των προαναφερθέντων δι- και τριπεπτιδίων που είχαν συντεθεί. Οι σταθερές αναστολής  $K_i$  αυτών των πεπτιδίων ήταν εύκολο να προσδιορισθούν με συνεχή παρακολούθηση της υδρόλυσης του υποστρώματος "FALGPA" παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα.

Όλα τα πειράματα έγιναν ακριβώς στις ίδιες συνθήκες με αυτές των πειραμάτων προσδιορισμού των  $K_m$  και  $V_{max}$ , δηλαδή σε θερμοκρασία  $22^\circ\text{C}$  και σε ρυθμιστικό διάλυμα  $50 \text{ mM Tricine}$ ,  $0,4 M \text{ NaCl}$ ,  $10 \text{ mM CaCl}_2$   $\text{pH}=7,5$ .

Παρακολουθήθηκε η υδρόλυση του υποστρώματος σε μια περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος από  $[S]=0,02 \text{ Km}$  έως  $[S]=0,4 \text{ Km}$ , όπου σ' αυτή την περιοχή ως γνωστό υπάρχει γραμμική εξάρτηση της υδρόλυσης συναρτήσεως του χρόνου. Η παρακολούθηση της υδρόλυσης έγινε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.

Έτσι παρασκευάσθηκαν τρία διαλύματα, συγκεντρώσεων  $0,05 \times 10^{-3} M$ ,  $0,10 \times 10^{-3} M$  και  $0,15 \times 10^{-3} M$  για κάθε πεπτιδιο-αναστολέα. Η ακριβής συγκέντρωση των πεπτιδίων της κυστεΐνης και επομένως και η ελεύθερη  $-SH$  ομάδα υπολογίσθηκε με τη μέθοδο Ellman. Επίσης παρασκευάσθηκε ένα διάλυμα του ενζύμου με κατάλληλη αραιώση στο προαναφερθέν ρυθμιστικό διάλυμα, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στην κυψελίδα να είναι  $4 \mu\text{gr/ml}$ .



Στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια με τη σειρά που αναφέρονται, μετρημένα ακριβώς με μικροσιφώνια ή μικροσύριγγα (για το ένζυμο).

- α) 1,93 ml διαλύματος υποστρώματος
- β) 0,05 ml διαλύματος αναστολέα
- γ) 0,02 ml διαλύματος ενζύμου

Συνολικός όγκος διαλύματος στη κυψελίδα είναι 2 ml. Κάθε μέτρηση απαιτεί χρόνο περίπου 3 min από τη στιγμή μηδέν.

Αφού προστεθούν στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου τα αντιδραστήρια -με τη σειρά που αναφέρονται πιο πάνω- εκτός από το ένζυμο, τοποθετείται η κυψελίδα στο όργανο και αφήνεται για 5' ώστε το εντός αυτής διάλυμα να θερμοστατηθεί στους 22°C. Ακολουθεί η προσθήκη του ενζύμου, γρήγορη ανάδευση και αμέσως καταγράφεται η πτώση της απορρόφησης σαν συνάρτηση του χρόνου σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Προσεκτική ανάλυση εν συνεχεία των πειραματικών δεδομένων θα μας οδηγήσει στον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $V_{max}$  του υποστρώματος, καθώς και των σταθερών αναστολής  $K_i$ .

Μετρήσεις UV. Οι μετρήσεις UV έγιναν σε ένα φασματοφωτόμετρο Gilford και χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες 1 cm.

Μετρήσεις pH. Οι μετρήσεις pH έγιναν σε πεχάμετρο Radiometer 82.



## Χ. Αποτελέσματα κινητικής μελέτης των παρασκευασθέντων αναστολέων.

Για τον ακριβή προσδιορισμό των σταθερών αναστολής  $K_i$  των προαναφερθέντων πεπτιδίων, πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη της ενζυματικής αναστολής με τη βοήθεια του χρωμοφόρου υποστρώματος FA-Leu-Gly-Pro-Ala ή "FALGPA" που όπως αναφέρθηκε, προσφέρει τη δυνατότητα μιας συνεχούς φασματοφωτομετρικής μεθόδου κινητικής μελέτης του ενζύμου.

Πριν τον προσδιορισμό όμως των σταθερών αναστολής  $K_i$  προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι του υποστρώματος:  $K_m$  = σταθερά Michaelis Menten και  $V_{max}$  = μέγιστη ταχύτητα.

### Χ.1. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων $K_m$ και $V_{max}$

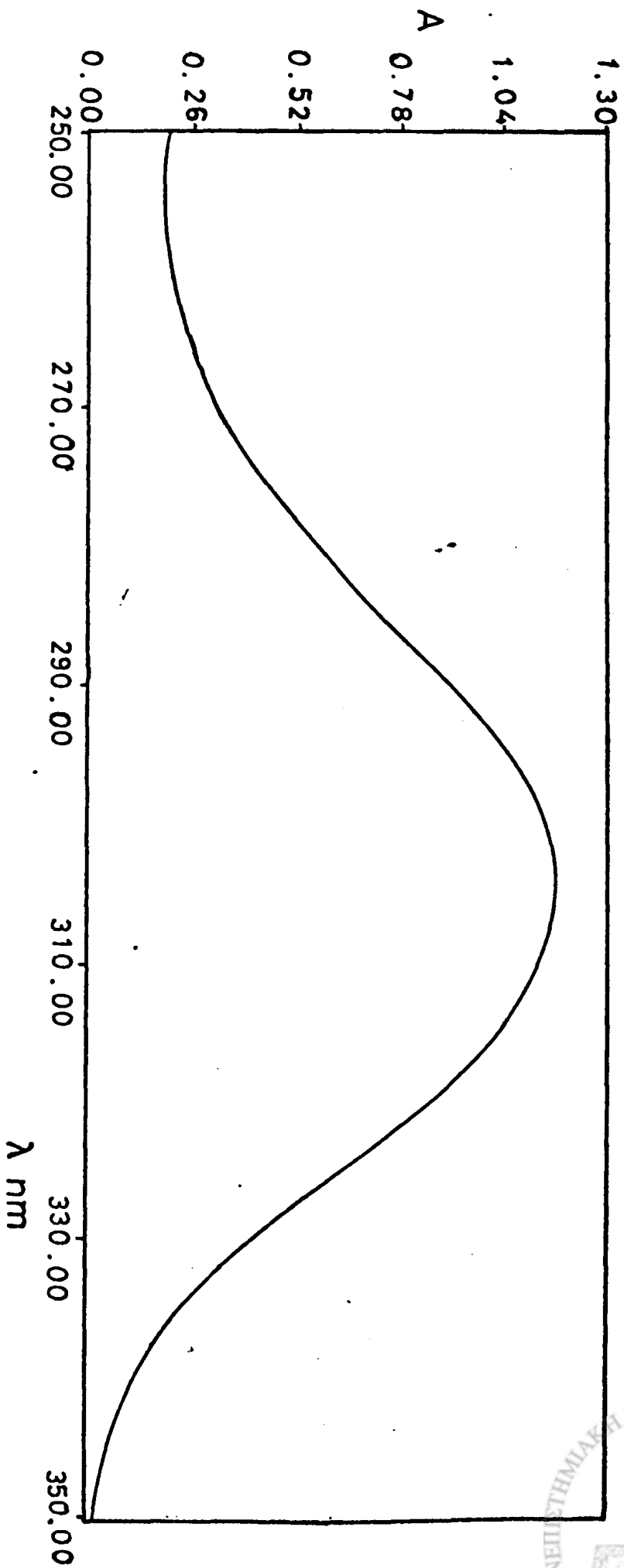
Για τον προσδιορισμό των  $K_m$  και  $V_{max}$  παρακολυθηθήκη η ελάττωση της απορρόφησης του υποστρώματος "FALGPA", αμέσως μετά τη προσθήκη του ενζύμου μιας σειράς διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος.

Το ηλεκτρονιακό φάσμα UV-Vis του υποστρώματος μελετήθηκε στην περιοχή 280-420 nm και παρουσίασε μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda=306$  nm με  $\epsilon=26.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Σχ.52). Επίσης μετά την προσθήκη της κολλαγενάσης το μέγιστο αυτό μετατοπίσθηκε προοδευτικά κατά ένα μικρό συντελεστή, σε μήκος κύματος  $\lambda=301$  nm, και ελήφθει το ίδιο ακριβώς φάσμα με αυτό του FALGPA.

Παρακολυθηθήκη η υδρόλυση του υποστρώματος σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από  $0.05 \times 10^{-3}$  -  $1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$  προσθέτοντας κάθε φορά στην κυβελίδα του φασματοφωτόμετρου 1,98 ml διαλύματος "FALGPA" αντίστοιχης συγκέντρωσης σε ρυθμιστικό Tricine (pH=7,5) και 0,020 ml διαλύματος ενζύμου τόσης αραίωσης ώστε η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στην κυβελίδα να είναι 4  $\mu\text{gr/ml}$ .

Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος καταγράφηκε η πτώση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Από το σύνολο δε των γραφικών παραστάσεων προκύπτουν τα συμπεράσματα:





**Σχήμα 52.** Ηλεκτρονικά φάσμα απορρόφησης του "FALGPA" σε πυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7.5, 22°C.



α) Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος όπως  $0.01 \times 10^{-3} M$  η  $A_{224}$  μειώνεται εκθετικά σε συνάρτηση με το χρόνο, αποδεικνύοντας έτσι ότι η αντίδραση ακολουθεί κινητική 1ης τάξης σε σχέση με το υπόστρωμα (σχ.53).

β) Σε ενδιάμεσες και υψηλές συγκεντρώσεις όπως π.χ.  $0.05 \times 10^{-3} M$  η  $A_{224}$  μειώνεται γραμμικά συνάρτησε του χρόνου και η αντίδραση επομένως ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης (σχ.54).

γ) Σε όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος ο ρυθμός πτώσης της απορρόφησης είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της κολλαγενάσης (σχ.55).

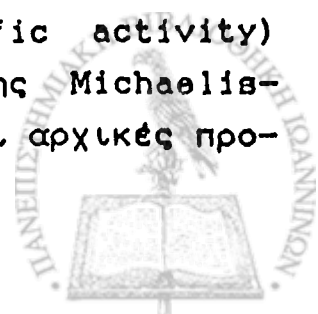
Οι κινητικές παράμετροι για την καταλυτική υδρόλυση του FALGPA από την κολλαγενάση υπολογίσθηκαν από τα δεδομένα των Lineweaver-Burk για διάγραμμα αντιστρόφων των ειδικών ενεργοτήτων (specific activity), ως προς τις αντίστροφες συγκεντρώσεις του υποστρώματος.

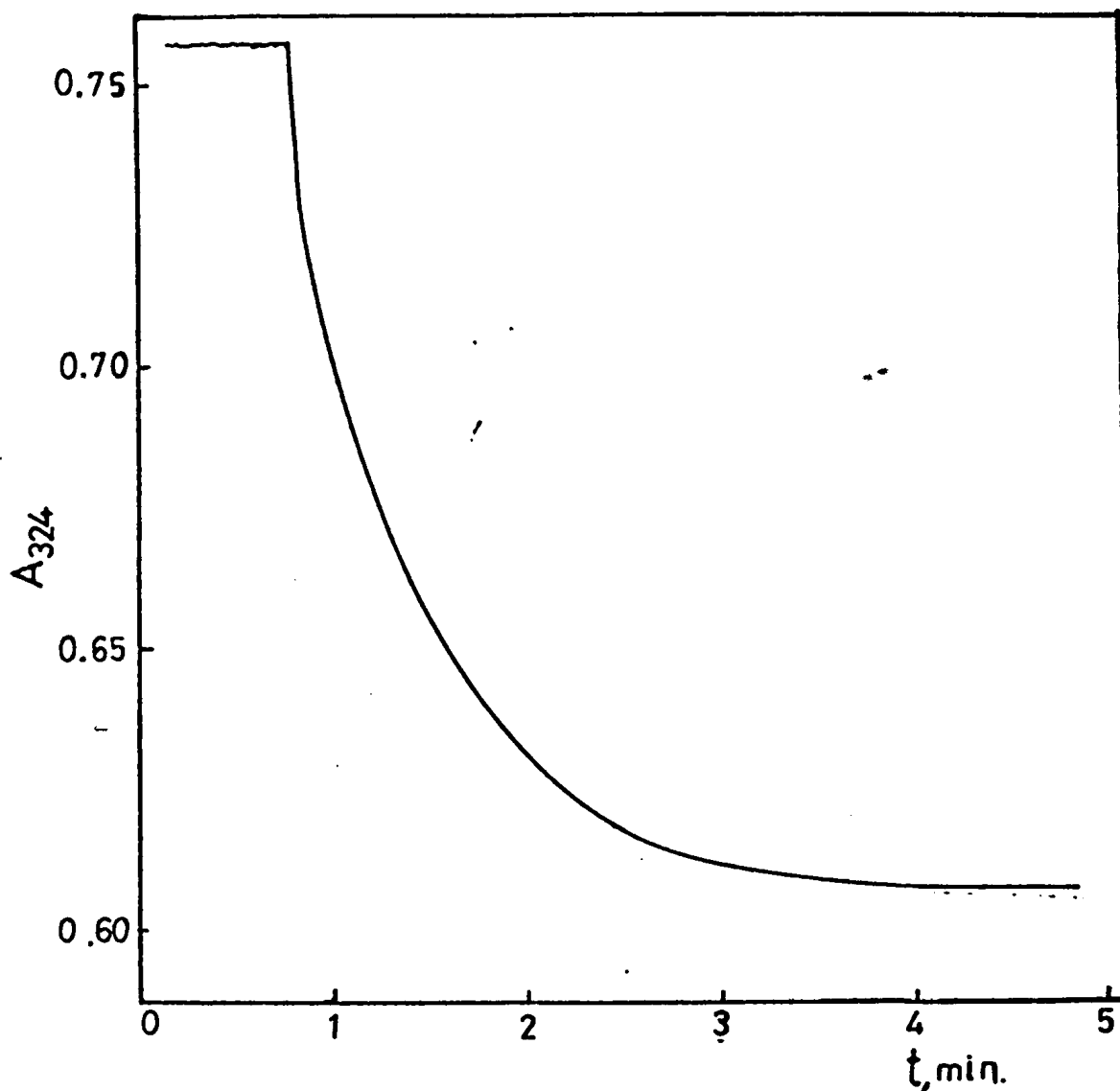
Οι αρχικές ταχύτητες υπολογίσθηκαν από την κλίση της καμπύλης της πτώσης της απορρόφησης κατά την χρονική διάρκεια του πρώτου 10% της υδρόλυσης και μετατράπηκαν σε μονάδες microkatal (μmoles/sec), διαιρώντας με την αλλαγή της απορρόφησης που αντιστοιχεί στην πλήρη υδρόλυση και πολλαπλασιάζοντας με την υπάρχουσα ποσότητα του υποστρώματος. Ειδικές ενεργότητες σε μονάδες  $\mu\text{katal}/\text{Kgr}$  υπολογίσθηκαν διαιρώντας τις παραπάνω αρχικές ταχύτητες με την υπάρχουσα ποσότητα του ενζύμου σε Kgr. Δηλαδή ο τύπος που μας δίνει την ειδική ενεργότητα είναι:

$$S.A = \text{ειδική ενεργότητα} = \frac{\Delta A_{10\%}}{\Delta t_{10\%}} \times \frac{(\text{ποσότητα υποστρ.})_{\mu\text{moles}}}{\Delta A_{\tau=2.}} (\text{ποσότητα ενζύμου})_{\text{Kgr}} \quad (8)$$

Οι ειδικές ενεργότητες που υπολογίσθηκαν από την σχέση (8) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υποστρώματος, καθώς και οι αντίστροφες τιμές τους αναφέρονται στον Πίνακα 7.

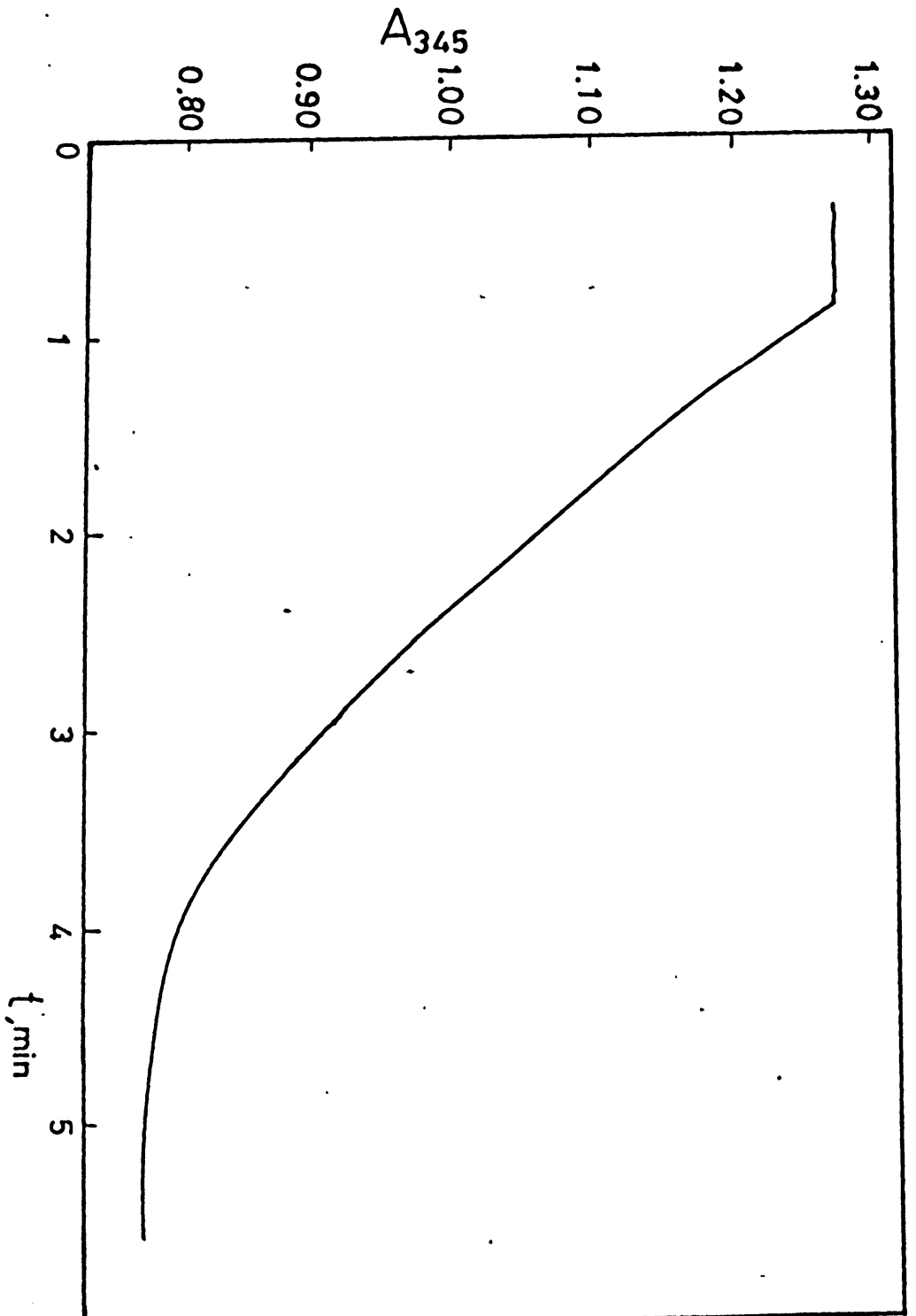
Για τον ακριβή υπολογισμό των κινητικών σταθερών  $K_m$  και  $V_{max}$  έγινε προσαρμογή των δεδομένων S.A. (specific activity) ως προς S στην μη γραμμική μορφή της εξίσωσης Michaelis-Menten. Πριν από αυτό, και για να υπολογισθούν οι αρχικές προ-





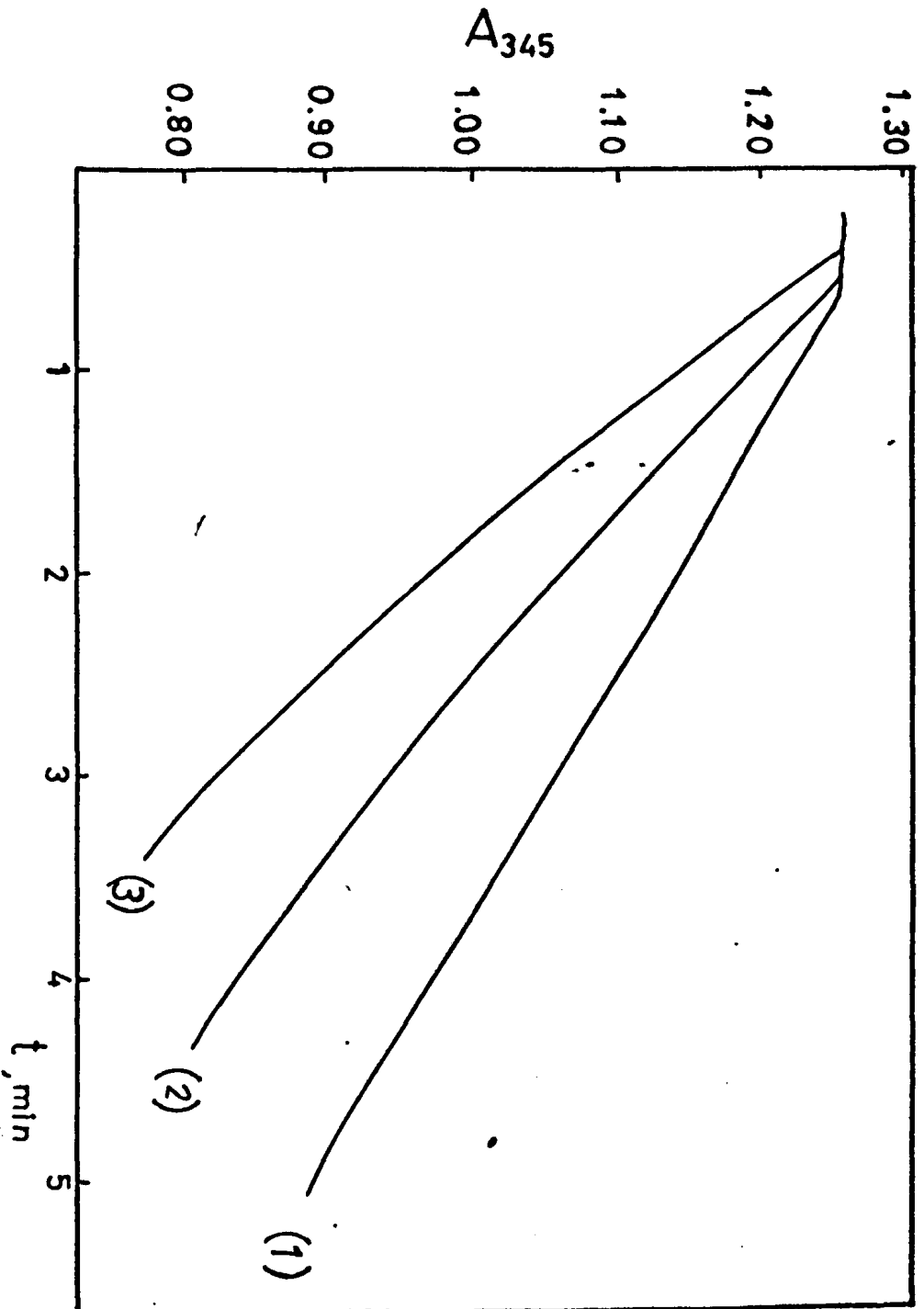
Σχήμα 53. Η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος  $\lambda=324$  nm ενός διαλύματος "FALGPA" συγκέντρωσης  $0.01 \times 10^{-3}$  M σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH=7.5, 22°C, μετά την προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  κολλαγενάσης.





Σχήμα 54. Η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος  $\lambda=345$  nm ενός διαλύματος "FALGPA" συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^{-3}$  M σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH=7.5, 22°C, μετά την προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  κολλαγόνου.





**Σχήμα 55.** Η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος  $\lambda=345$  nm ενός διαλύματος "FALGPA" συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^{-5}$  M σε πυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7.5, 22°C, μετά την προσθήκη 20  $\mu$ l καλθαενόνης τελικής συγκέντρωσης: (1): 4 mgr/ml

(2): 8 mgr/ml

(3): 12 mgr/ml



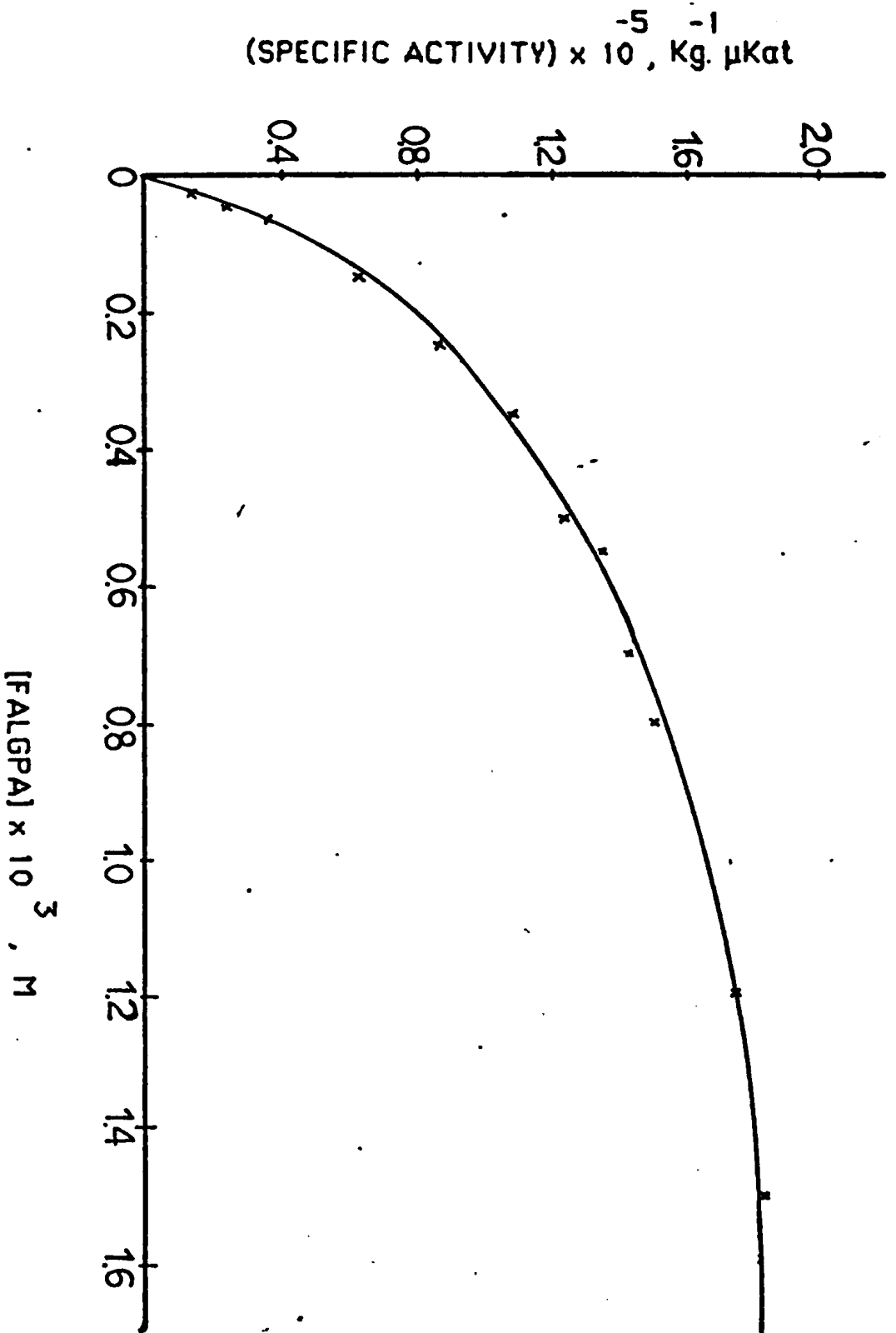
σεγχλσεις της Km εγινε προσαρμογή στην γραμμική μορφή κατά Lineweaver-Burk. Και στις δύο περιπτώσεις εφαρμόσθηκε η μέθοδος των ελαχιστων τετραγώνων<sup>120</sup>.

Πίνακας 7. Οι ειδικές ενεργότητες καθώς και οι αντιστροφες τιμές αυτών σε διάφορες συγκεντρώσεις \*FALGPA\*.

[FALGPA] X10 <sup>-3</sup> M	SPEŠIFIC-ACTIVITY* X 10 <sup>3</sup> (μKat X Kgr <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> X10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup>	(SPEŠIFIC-ACTIVITY) <sup>-1</sup> * X 10 <sup>-3</sup> (Kgr X μKat <sup>-1</sup> )
0,025	0,12	40,00	8,33
0,05	0,22	20,00	4,55
0,075	0,33	13,33	3,03
0,15	0,63	6,67	1,59
0,20	0,67	5,00	1,49
0,25	0,79	4,00	1,27
0,30	0,88	3,33	1,14
0,35	0,97	2,86	1,03
0,40	1,03	2,50	0,97
0,45	1,10	2,22	0,91
0,50	1,20	2,00	0,83
0,55	1,27	1,82	0,79
0,70	1,37	1,43	0,73
0,80	1,45	1,25	0,69
1,20	1,75	0,83	0,61
1,50	1,84	0,67	0,58

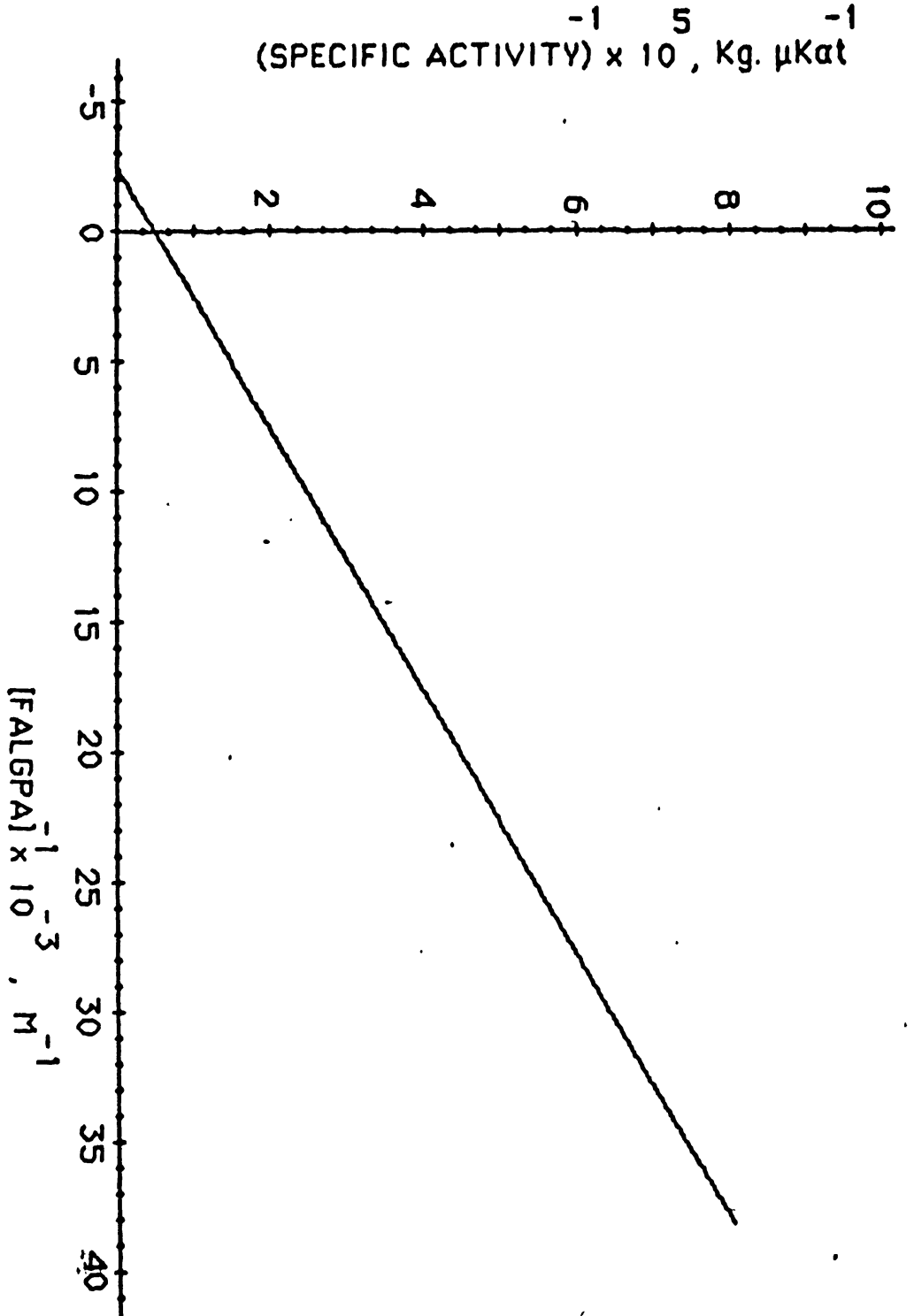
\* SPEŠIFIC ACTIVITY = ειδική ενεργότητα





Σχήμα 56. Καμπύλη κορεσμού του ενζύμου *Clostridium histolyticum* κολλαγένης με υπόστρωμα FALGPA κατά Michaelis-Menten. Ο άξονας των τεταγμένων παρουσιάζει την ειδική δραστηριότητα (SPECIFIC ACTIVITY), αντί της ταχύτητας της αντίδρασης.





Σχήμα 57. Καμπύλη κορεσμού του ενζύμου *Clostridium histolyticum* κολλαγενάσης με υποστρώμα FALGPA κατά Lineweaver-Burk. Οι άξονες παριστάνουν το αντίστροφο των αντίστοιχων ποσοτήτων του Σχήματος 56.



Το σχήμα 57 δείχνει ότι η γραφική παράσταση είναι γραμμική και χωρίς κινητικές ανωμαλίες και επομένως το σύστημα αποδεικνύει Michaelis-Menten κινητική με:

$$V_{\max} = 2,2 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{Kat/ Kgr} \text{ και } K_m = 0,44 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών παρατηρούμε ότι βρίσκονται σε συμφωνία (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Σύγκριση τιμών  $K_m$  και  $V_{\max}$  από διάφορες πηγές για το ένζυμο *Clostridium histolyticum* κολλαγενάση με υπόστρωμα FALGPA.

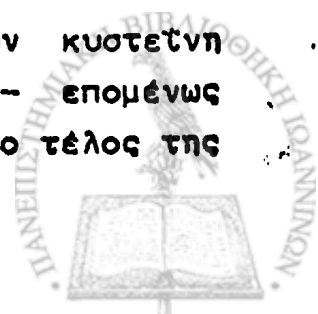
Αποτελέσματα	$K_m$ (M)	$V_{\max}$ ( $\mu\text{Kat/Kgr}$ )
παρούσης εργασίας	$0,44 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
Van Wart	$0,50 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$
Powers	$0,45 \times 10^{-3}$	

## Χ.2. Προσδιορισμός των σταθερών αναστολής $K_i$

Οι σταθερές αναστολής  $K_i$  όλων των πεπτιδικών αναστολέων που συνθέθηκαν προσδιορίστηκαν με συνεχή παρακολούθηση της υδρόλυσης του υποστρώματος "FALGPA" παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα.

Για κάθε αναστολέα παρακολουθήθηκε ο ρυθμός ελάττωσης της απορρόφησης σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $0,05 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $0,10 \times 10^{-3} \text{ M}$  και  $0,15 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Ιδιαίτερα για τους αναστολείς που περιέχουν κυστεΐνη προσδιορίστηκε το ποσοστό της ελεύθερης -SH ομάδας - επομένως και η συγκέντρωση του αναστολέα - στην αρχή και στο τέλος της



όλης πειραματικής διαδικασίας, με τη μέθοδο Ellman. και οι τιμές των απορροφήσεων αναφέρονται στον πίνακα 9. Παρατηρούμε ότι η απορρόφηση του διαλύματος κάθε αναστολέα πρακτικά δεν μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα να θεωρείται, ότι ουσιαστικά δεν υπάρχει περαιτέρω οξειδωση της κυστεΐνης, όση ώρα διαρκούν τα πειράματα κάθε αναστολέα και που είναι περίπου μία ώρα.

Με βάση τις τιμές της απορρόφησης και τις σχέσεις (9), (10), (11) υπολογίσθηκε το ποσοστό %SH κάθε αναστολέα και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 9.

$$\text{Πειραμ.τιμή} = \frac{A}{\epsilon L} \quad (9)$$

$$\text{Θεωρητ.τιμή} = \frac{\text{mmol}_{\text{ανασ.}}}{2 \text{ ml}_{\text{buffer}}} \times \frac{(\text{όγκος διαλ.ανασ.})_{\text{ml}}}{(\text{συνολ.όγκος διαλ.})_{\text{ml}}} =$$

$$= \frac{(\text{ποσότητ.αναστ.})_{\text{mmol}}}{2 \text{ ml buffer}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{(\text{MB αναστ.})_{\text{mmol}}} \times \frac{(\text{όγκος διαλ.ανασ.})_{\text{ml}}}{(\text{συνολ.όγκ.διαλ.})_{\text{ml}}} \quad (10)$$

$$\% \text{ SH} = \frac{\text{πειραμ.τιμή}}{\text{θεωρητ.τιμή}} \times 100 \quad (11)$$

όπου  $A$  = απορρόφηση διαλύματος

$\epsilon$  = μοριακός συντελεστής απορρόφησης

$L$  = μήκος της οπτικής διαδρομής

$(\text{ποσότητα αναστ.})_{\text{mmol}}$  = ποσότητα αναστολέα που διαλύεται σε 2 ml ρυθμιστικού.

$(\text{όγκος διαλ.ανασ.})_{\text{ml}}$  = ο όγκος του διαλύματος του αναστολέα που προστίθεται στο υπό μέτρηση διάλυμα.

$(\text{συνολικός όγκος διαλ.})_{\text{ml}}$  = συνολικός όγκος του υπό μέτρηση διαλύματος.

Απ'όλη τη σειρά των πειραμάτων που έγιναν, θα αναφερθεί ενδεικτικά η περίπτωση του τριπεπτιδίου D-Ala-D-Pro-L-Cys που τελικά αποδείχθηκε και ο πιο ισχυρός αναστολέας.



Πίνακας 9. Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων κυστεΐνο -πεπτιδίων στα 412 nm στις χρονικές στιγμές  $t_1=0\text{min}$  και  $t_2=60\text{min}$  καθώς και το αντίστοιχο ποσοστό της ελεύθερης -SH ομάδας.

Αναστολέας	$A_{412}$ $t_1=0\text{min}$	$A_{412}$ $t_2=60\text{min}$	%SH ελεύθερη
D-Pro-L-Cys	0.990	0.995	87%
L-Pro-L-Cys	1.015	1.000	88%
D-Ala-D-Pro-L-Cys	0.875	0.865	76%
L-Ala-L-Pro-L-Cys	0.645	0.639	58%

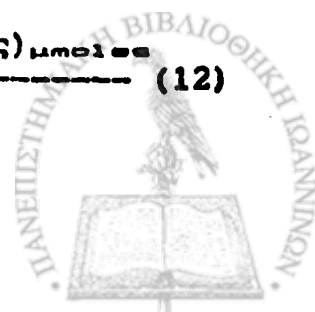
Παρακολουθήθηκε η υδρόλυση του υποστρώματος παρουσία αναστολέα, σε συγκεντρώσεις υποστρώματος  $0.025 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $0.05 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $0.075 \times 10^{-3}\text{M}$  και  $0.15 \times 10^{-3}\text{M}$  και για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα και συγκεκριμένα σε  $[I_1]=0.038 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $[I_2]=0.076 \times 10^{-3}\text{M}$  και  $[I_3]=0.114 \times 10^{-3}\text{M}$ .

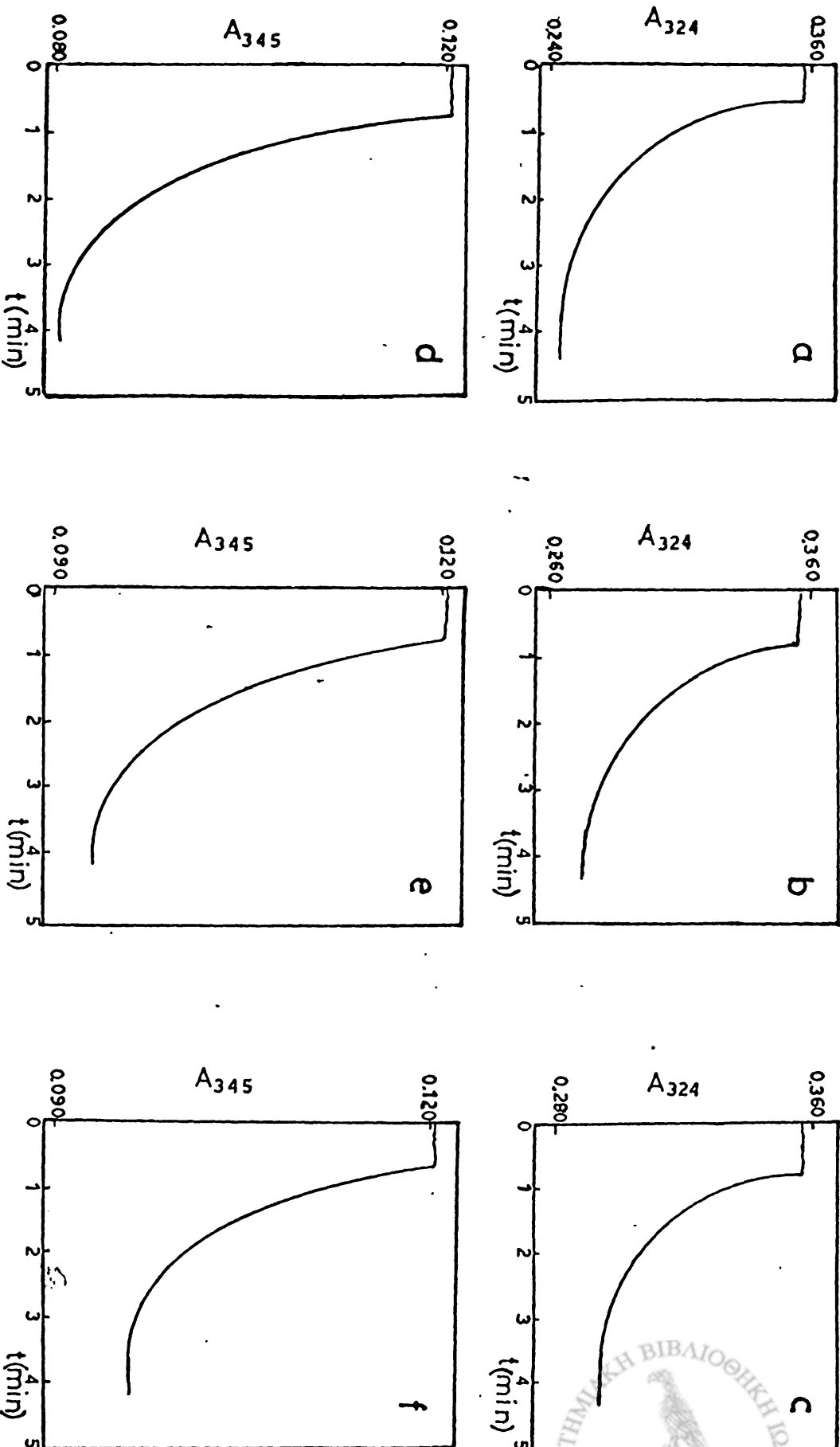
Σε κάθε συγκέντρωση υποστρώματος και αντίστοιχη συγκέντρωση αναστολέα καταγράφηκε η πτώση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου (σχ.58) και υπολογίσθηκε η μεταβολή της απορρόφησης που αντιστοιχεί σε πλήρη υδρόλυση  $(\Delta A)_{\infty}$  και η μεταβολή της απορρόφησης στο πρώτο 10% της υδρόλυσης  $(\Delta A)_{10\%}$ .

Η σταθερά αναστολής  $K_i$ , υπολογίσθηκε από τα δεδομένα των Lineweaver-Burk για διαγράμματα αντιστροφών των ειδικών ενεργοτήτων (specific activity) ως προς τις αντίστροφες συγκεντρώσεις του FALGPA.

Οι ειδικές ενεργότητες υπολογίσθηκαν από την σχέση:

$$S.A. = \text{ειδική ενεργότητα} = \frac{\Delta A_{10\%}}{\Delta t_{10\%}} \times \frac{(\text{ποσ. υποστρώματος})_{\mu\text{mol l}^{-1}}}{\Delta A_{\infty} \cdot (\text{ποσ. ενζύμου})_{\text{kg}} \cdot 10^6} \quad (12)$$





**Σχήμα 5B.** Η μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος "FALGPA" σε ψευδιστικό διάλυμα Tricine παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Ala-D-Pro-L-Cys.

- a : [FALGPA] =  $0.075 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.039 \times 10^{-3}$  M
- b : [FALGPA] =  $0.075 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.076 \times 10^{-3}$  M
- c : [FALGPA] =  $0.075 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.114 \times 10^{-3}$  M
- d : [FALGPA] =  $0.150 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.039 \times 10^{-3}$  M
- e : [FALGPA] =  $0.150 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.076 \times 10^{-3}$  M
- f : [FALGPA] =  $0.150 \times 10^{-3}$  M και [D-Ala-D-Pro-L-Cys] =  $0.114 \times 10^{-3}$  M





Με βάση τις τιμές του Πίνακα 10 έγινε η γραφική παράσταση των κινητικών δεδομένων του αναστολέα με τη μέθοδο Lineweaver-Burk (σχ.59) και στο διάγραμμα που προκύπτει παρατηρούμε τα εξής:

α) Σε κάθε συγκέντρωση αναστολέα αντιστοιχεί καινούργια ευθεία, της οποίας η κλίση αυξάνεται αυξανομένης της συγκέντρωσης.

β) Όλες οι ευθείες τέμνουν την τεταγμένη στο ίδιο σημείο, ( $V_{max}$ =σταθερό) και την τετμημένη σε διαφορετικά σημεία ( $K_{m,app}$  αυξάνει, αυξανομένης της  $[I]$ ).

Επομένως ο αναστολέας που μελετάται είναι τύπου συναγωνιστικός, (competitive) και ο υπολογισμός της σταθεράς  $K_i$  γίνεται βάσει της σχέσης:

$$\frac{1}{K_{m,app}} = \frac{1}{K_m(1 + [I]/K_i)}$$

Αντιστοίχα πειράματα έγιναν και με τους άλλους αναστολείς και από τις γραφικές παραστάσεις πτώσης της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου υπολογίσθηκαν η τελική μεταβολή της απορρόφησης  $(\Delta A)_{\infty}$ , η μεταβολή της απορρόφησης στο πρώτο 10%  $(\Delta A)_{10\%}$ , και με βάση τις τιμές αυτές και την σχέση (12) υπολογίσθηκαν οι ειδικές ενεργότητες (specific activity) σε μονάδες  $\mu\text{Kat}/\text{Kgr}$  (Πίνακες 11-21).

Ανάλυση εν συνεχεία των κινητικών δεδομένων με τη μέθοδο Lineweaver-Burk (σχήματα 60-70) δείχνει ότι όλα τα πεπτιδία που μελετήθηκαν είναι συναγωνιστικοί (competitive) αναστολείς. Συγκεκριμένα από τα διαγράμματα αυτών παρατηρούμε ότι ενώ η  $V_{max}$  παραμένει σταθερή, η  $K_{m,app}$  αυξάνεται, αυξανομένης της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Σε κάθε συγκέντρωση αναστολέα υπολογίσθηκε η σταθερά αναστολής  $K_i$  και στη συνέχεια ελήφθη σαν σταθερά αναστολής του πεπτιδίου, η μέση τιμή των τριών  $K_i$ , που αντιστοιχούν στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, δηλαδή

$$K_i = \frac{K_{i_1} + K_{i_2} + K_{i_3}}{3}$$



Οι σχετικές δραστηκότητες (relative-potencies) υπολογίσθηκαν σε σχέση με το τριπεπτιδίο D-Ala-D-Pro-L-Cys (100%), που είναι και ο πιο ισχυρός αναστολέας (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Σταθερές αναστολής Κί των παρασκευασθέντων πεπτιδίων για την Clostridium κολλαγενάση. Οι σχετικές δραστηκότητες υπολογίσθηκαν σε σχέση με το τριπεπτιδίο D-Ala-D-Pro-L-Cys (100%).

Αναστολέας	Σταθερά αναστολής Κί (μΜ)	Σχετική δραστηκότητα
D-Pro-L-Asp	70	93
D-Ala-D-Pro-L-Asp	85	76
L-Pro-L-Asp	135	48
L-Ala-L-Pro-L-Asp	115	57
D-Pro - Gly	131	50
D-Ala-D-Pro - Gly	77	84
D-Pro-L-Ser	145	45
D-Ala-D-Pro-L-Ser	116	56
D-Pro-L-Cys	70	93
D-Ala-D-Pro-L-Cys	65	100
L-Pro-L-Cys	146	44
L-Ala-L-Pro-L-Cys	80	81



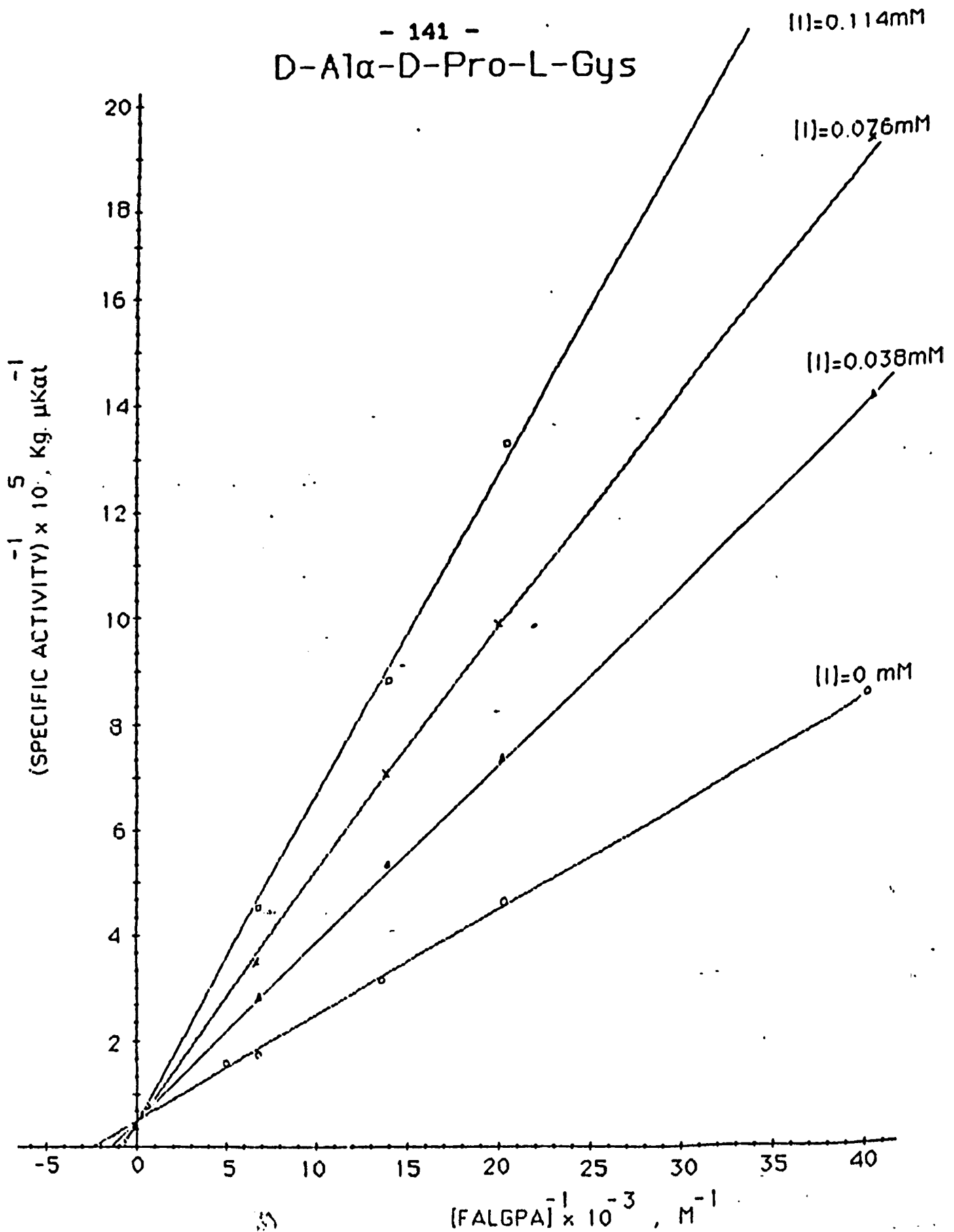


**Πίνακας 10.** Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>α-α</sub>) και (DA<sub>α-α</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 μοίχιτ<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.038 x 10<sup>-3</sup> μοίχιτ<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.076x10<sup>-3</sup> μοίχιτ<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.114x10<sup>-3</sup>μοίχιτ<sup>-1</sup> του D-Ala-D-Pro-L-Cys.

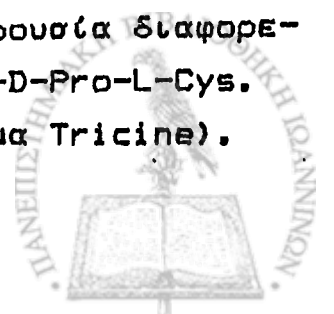
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.038x10 <sup>-3</sup> (μοίχιτ <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.076x10 <sup>-3</sup> (μοίχιτ <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.114x10 <sup>-3</sup> (μοίχιτ <sup>-1</sup> )
[FAΛΓΡΑ]x10 <sup>-3</sup> (μοίχιτ <sup>-1</sup> )	[FAΛΓΡΑ] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> x1l)	(ΔA) <sub>αα</sub> : : : : : : : : : :	(ΔA) <sub>αα</sub> : : : : : : : : : :	(ΔA) <sub>αα</sub> : : : : : : : : : :
		: (SPECIFIC * : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : (Καθαράτ <sup>-1</sup> )	: (SPECIFIC * : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : (Καθαράτ <sup>-1</sup> )	: (SPECIFIC * : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : (Καθαράτ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.042 : 0.006 : 14.08	0.059 : 0.006 : 19.57	0.062 : 0.005 : 25.00
0.050	20.00	0.095 : 0.013 : 7.25	0.125 : 0.013 : 9.71	0.144 : 0.011 : 12.81
0.075	13.33	0.158 : 0.021 : 5.00	0.190 : 0.019 : 6.67	0.195 : 0.015 : 8.65
0.150	6.66	0.037 : 0.005 : 2.70	0.043 : 0.004 : 3.56	0.063 : 0.005 : 4.23

\* SPECIFIC ACTIVITY = ειδική ενεργότητα

- 141 -  
D-Ala-D-Pro-L-Gys



Σχήμα 59. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της *Clostridium* κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Ala-D-Pro-L-Cys. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



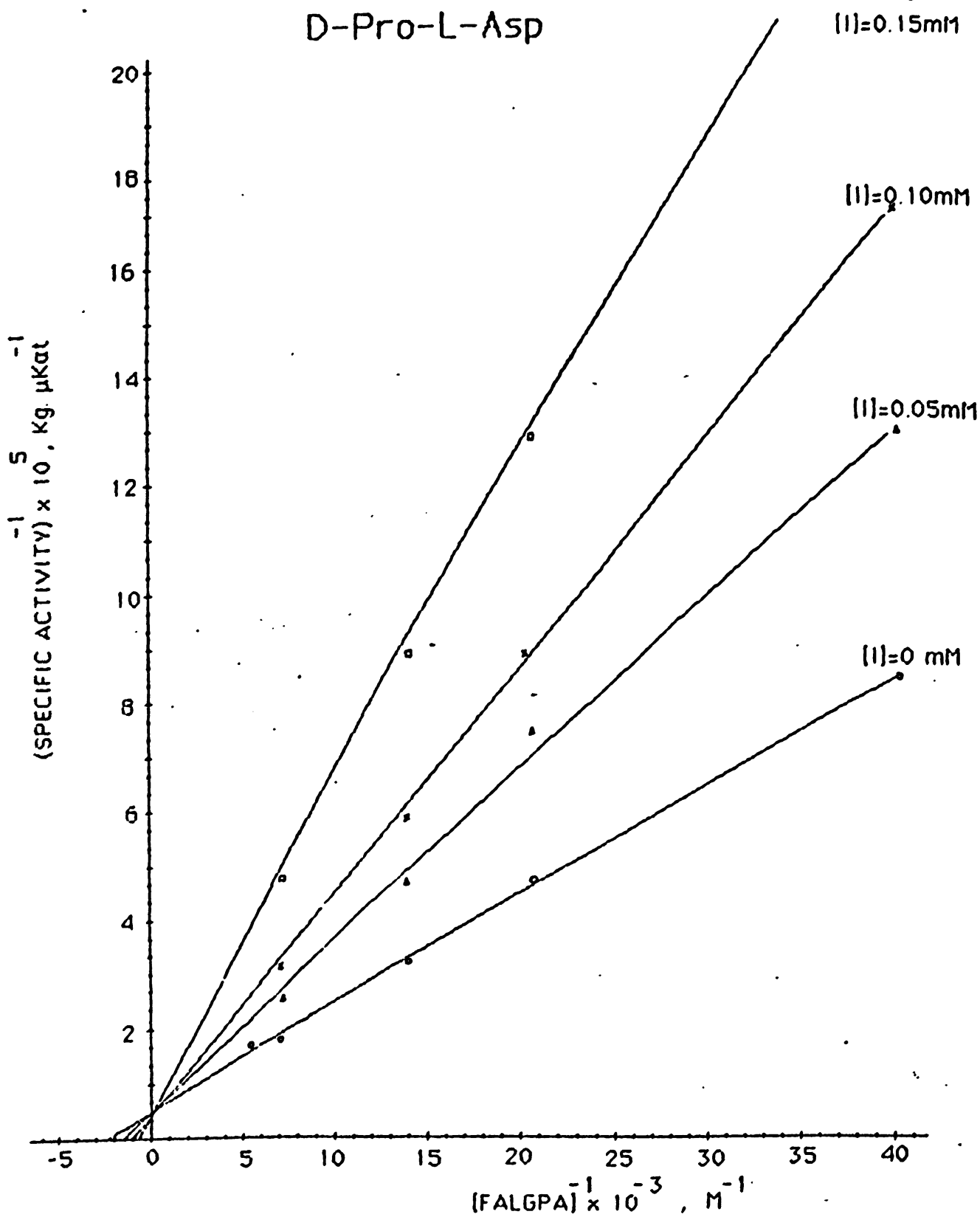


Πίνακας 11. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>αλ</sub>) και (DA<sub>ιοκ</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.100x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του D-Pro-L-Asp.

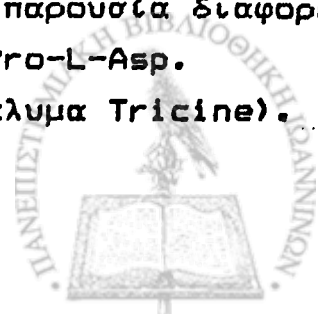
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·x·l)	(DA) <sub>αλ</sub> : : (DA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (K <sub>αλ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> ) : (K <sub>ιοκ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> )	(DA) <sub>αλ</sub> : : (DA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (K <sub>αλ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> ) : (K <sub>ιοκ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> )	(DA) <sub>αλ</sub> : : (DA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (DA) <sub>αλ</sub> ) <sub>αλ</sub> : (DA) <sub>ιοκ</sub> ) <sub>ιοκ</sub> : (K <sub>αλ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> ) : (K <sub>ιοκ</sub> ·κατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.065 : 0.010 : 12.94	0.060 : 0.007 : 17.06	0.055 : 0.004 : 24.40
0.050	20.00	0.133 : 0.019 : 9.09	0.109 : 0.012 : 8.69	0.140 : 0.011 : 12.66
0.075	13.33	0.206 : 0.030 : 4.60	0.171 : 0.020 : 5.73	0.204 : 0.016 : 8.70
0.150	6.66	0.059 : 0.008 : 2.45	0.055 : 0.006 : 3.05	0.063 : 0.005 : 4.53

\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

### D-Pro-L-Asp



**Σχήμα 60.** Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της *Clostridium* κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Pro-L-Asp. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).

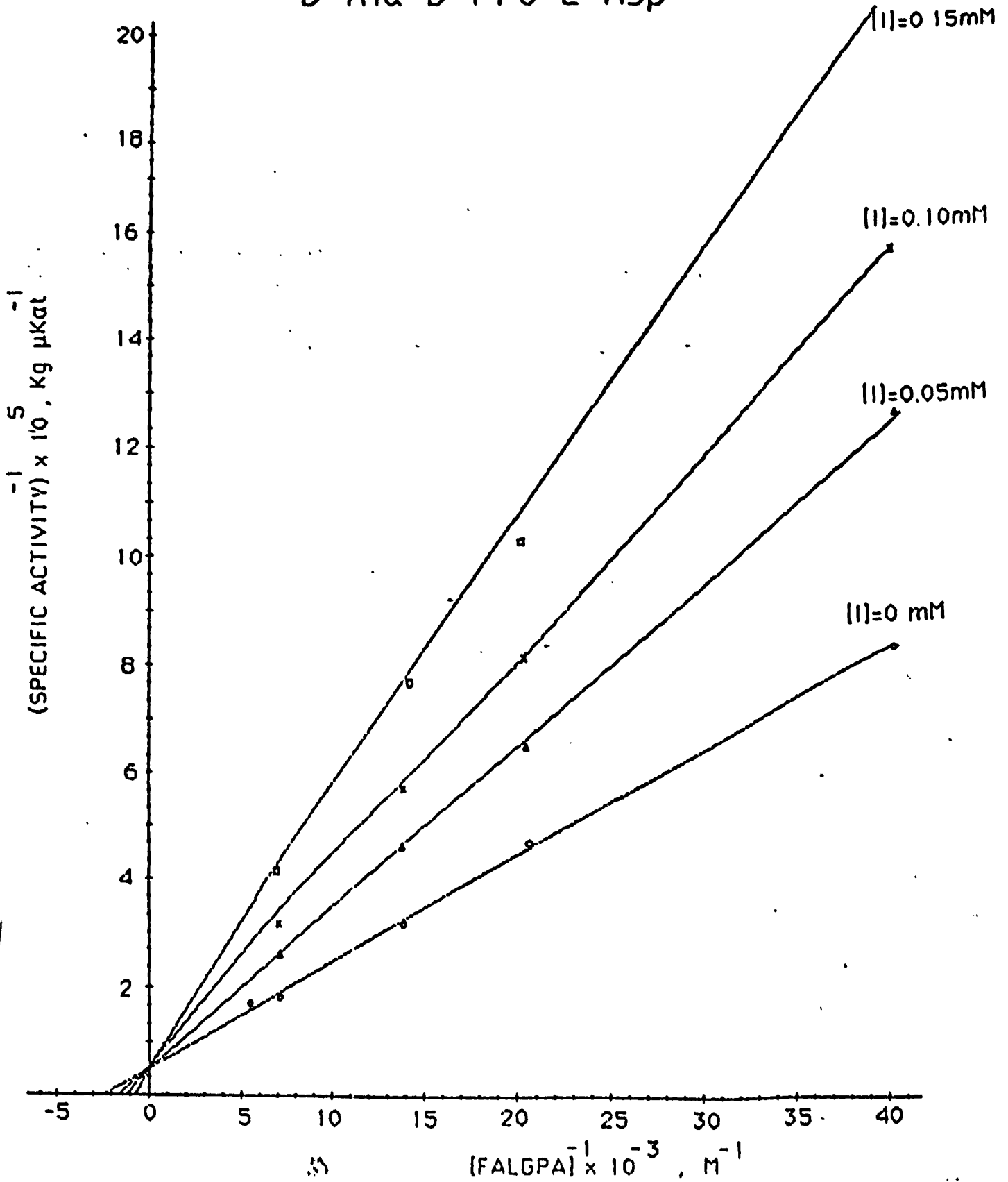


Πίνακας 12. Μεταβολή της απορρόφησης (DA) και (DA) σε μήκος κύματος  $\lambda=324\text{nm}$  και  $\lambda=345\text{nm}$ , για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος  $[S]=0.025-0.150$  μοιλιτέ<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα  $[I_1]=0.050 \times 10^{-3}$  μοιλιτέ<sup>-1</sup>,  $[I_2]=0.100 \times 10^{-3}$  μοιλιτέ<sup>-1</sup>,  $[I_3]=0.150 \times 10^{-3}$  μοιλιτέ<sup>-1</sup> του D-Ala-D-Pro-L-Asp.

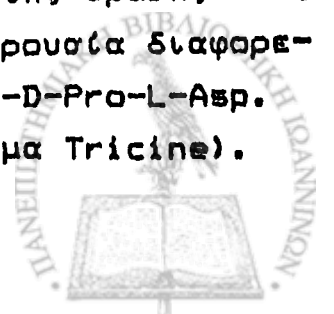
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mολιτε <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mολιτε <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mολιτε <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mολιτε <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mολ <sup>-1</sup> x10)	(DA) : : : : : : : (Kqηκατ <sup>-1</sup> )	(DA) : : : : : : : (Kqηκατ <sup>-1</sup> )	(DA) : : : : : : : (Kqηκατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.057 : 0.009 : 12.65	0.049 : 0.006 : 15.62	0.050 : 0.004 : 22.22
0.050	20.00	0.137 : 0.021 : 6.50	0.105 : 0.013 : 8.07	0.120 : 0.011 : 9.70
0.075	13.33	0.195 : 0.029 : 4.46	0.177 : 0.021 : 5.59	0.220 : 0.019 : 7.69
0.150	6.66	0.043 : 0.006 : 2.38	0.055 : 0.006 : 3.04	0.055 : 0.004 : 3.88

\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

D-Ala-D-Pro-L-Asp



Σχήμα 61. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Ala-D-Pro-L-Asp. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



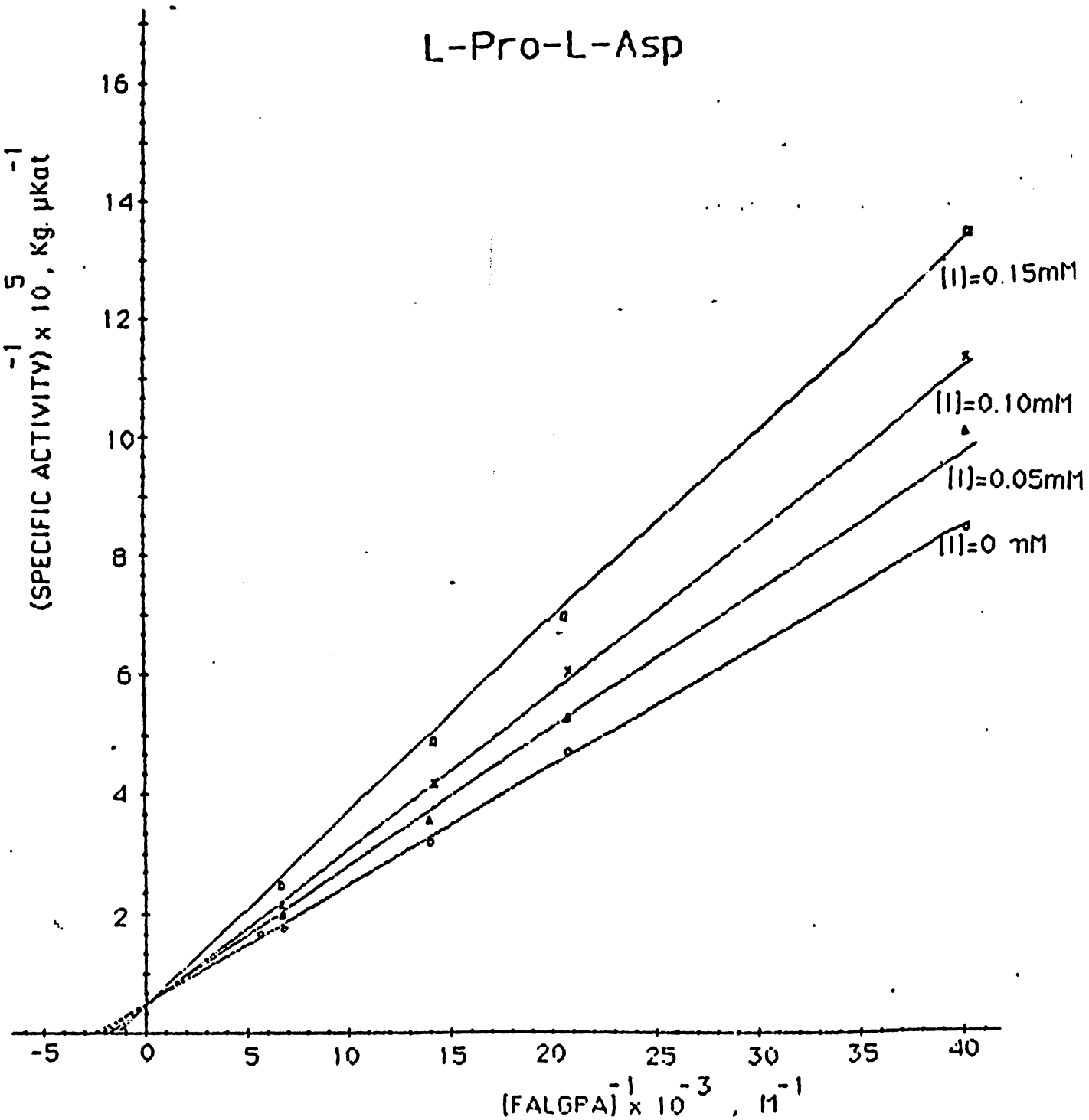




**Πίνακας 13.** Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>αλ</sub>) και (DA<sub>ιοκ</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.100x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του L-Pro-L-Asp.

[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μκατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μκατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μκατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.052 : 0.010 : 10.00	0.019 : 0.003 : 11.20	0.073 : 0.011 : 13.33
0.050	20.00	0.117 : 0.023 : 5.26	0.048 : 0.008 : 6.00	0.124 : 0.018 : 6.90
0.075	13.33	0.199 : 0.039 : 3.37	0.151 : 0.027 : 4.15	0.210 : 0.029 : 4.76
0.150	6.66	0.052 : 0.009 : 1.89	0.170 : 0.028 : 2.17	0.057 : 0.008 : 2.22

\* SPECIFIC ACTIVITY = εΙδική ενεργότητα



**Σχήμα 62.** Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της *Clostridium* κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα L-Pro-L-Asp. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).

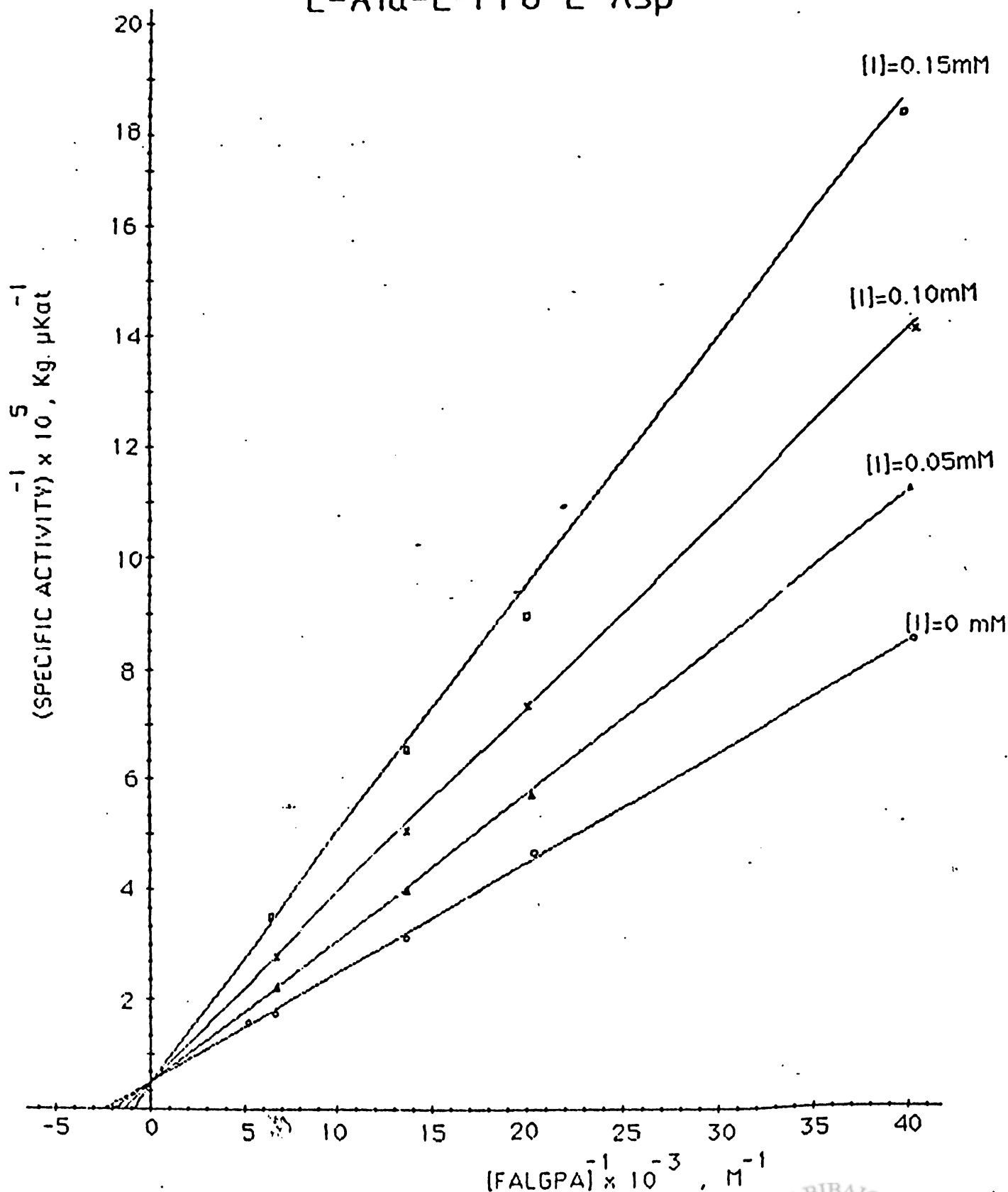


Πίνακας 14. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>εξ</sub>) και (DA<sub>10%</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·lit<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]=0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·lit<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>]=0.100x10<sup>-3</sup> mol·lit<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup> mol·lit<sup>-1</sup> του L-Ala-L-Pro-L-Asp.

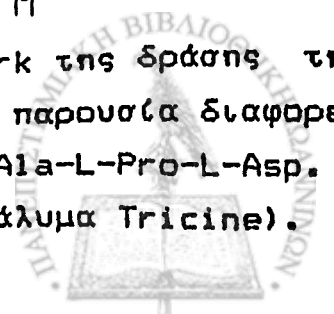
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·lit <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·lit <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·lit <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·lit <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> )	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : (ΔA) <sub>10%</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgxμkat <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : (ΔA) <sub>10%</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgxμkat <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : (ΔA) <sub>10%</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgxμkat <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.057 : 0.010 : 11.10	0.042 : 0.006 : 14.09	0.064 : 0.007 : 17.85
0.050	20.00	0.136 : 0.024 : 5.65	0.101 : 0.013 : 7.30	0.158 : 0.018 : 8.85
0.075	13.33	0.195 : 0.033 : 3.92	0.216 : 0.029 : 5.00	0.205 : 0.022 : 6.22
0.150	6.66	0.063 : 0.009 : 2.20	0.063 : 0.008 : 2.63	0.079 : 0.008 : 3.12

\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

### L-Ala-L-Pro-L-Asp



**Σχήμα 63.** Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα L-Ala-L-Pro-L-Asp. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



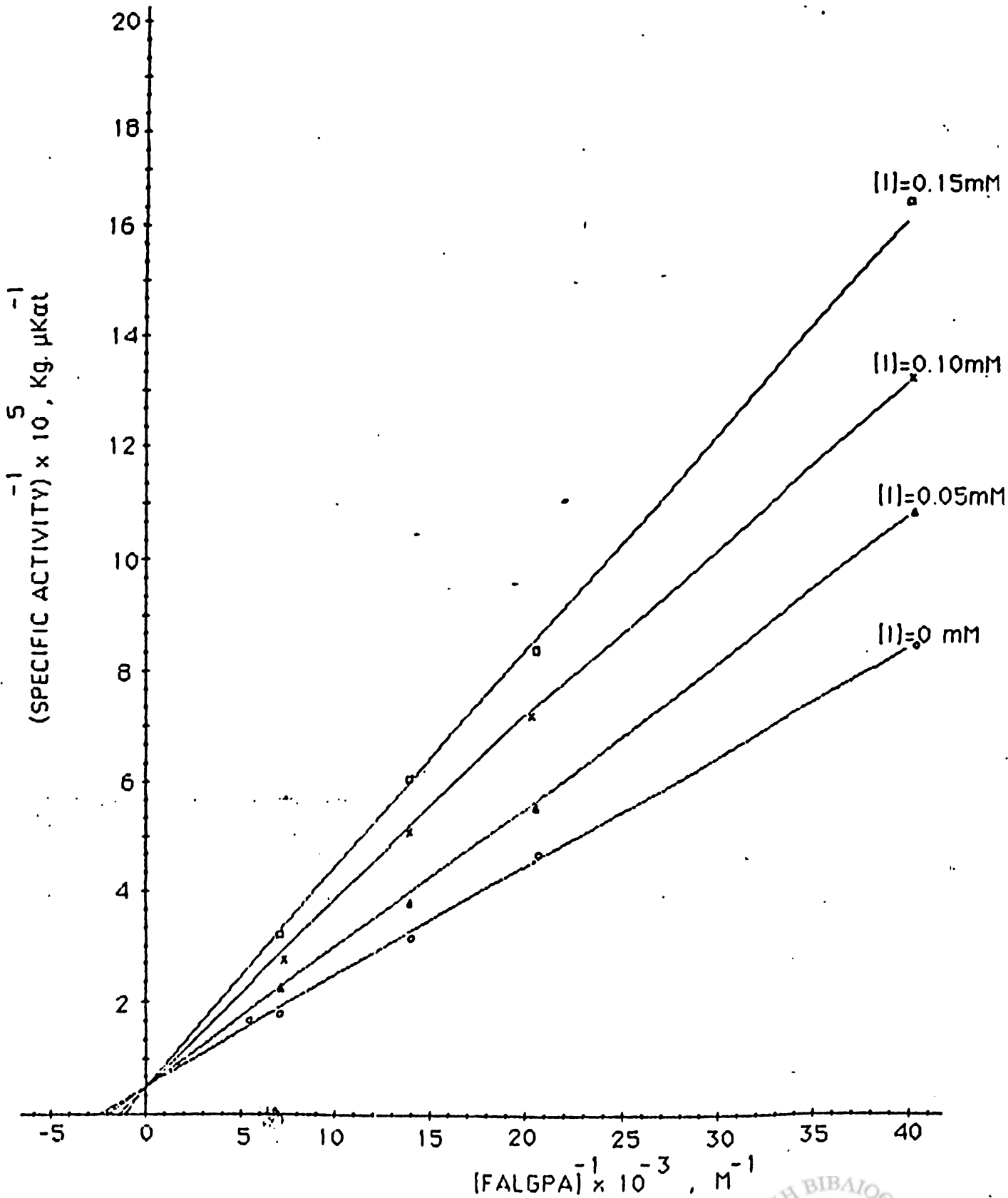


Πίνακας 15. Μεταβολή της απορρόφησης (ΔΑ<sub>α-α</sub>) και (ΔΑ<sub>α-α</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 μοίλιε<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]=0.050 x 10<sup>-3</sup> μοίλιε<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.100x10<sup>-3</sup> μοίλιε<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup> μοίλιε<sup>-1</sup> του D-Pro-Gly.

[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (μοίλιε <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (μοίλιε <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (μοίλιε <sup>-1</sup> )
[FA/GPA]x10 <sup>-3</sup> (μοίλιε <sup>-1</sup> )	[FA/GPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> x11)	(ΔΑ) <sub>α-α</sub> : : (SPECIFIC)* : : (ΔΑ)/10% : ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κοχμ)κατ <sup>-1</sup> )	(ΔΑ) <sub>α-α</sub> : : (SPECIFIC)* : : (ΔΑ)/10% : ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κοχμ)κατ <sup>-1</sup> )	(ΔΑ) <sub>α-α</sub> : : (SPECIFIC)* : : (ΔΑ)/10% : ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κοχμ)κατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.061 : 0.011 : 10.75	0.056 : 0.008 : 13.15	0.060 : 0.007 : 16.95
0.050	20.00	0.136 : 0.025 : 5.45	0.122 : 0.017 : 7.14	0.124 : 0.015 : 8.33
0.075	13.33	0.208 : 0.036 : 3.85	0.188 : 0.025 : 5.00	0.182 : 0.020 : 6.06
0.150	6.66	0.049 : 0.007 : 2.16	0.054 : 0.007 : 2.56	0.063 : 0.006 : 3.22

\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

### D-Pro-Gly



Σχήμα 64. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Pro-Gly. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



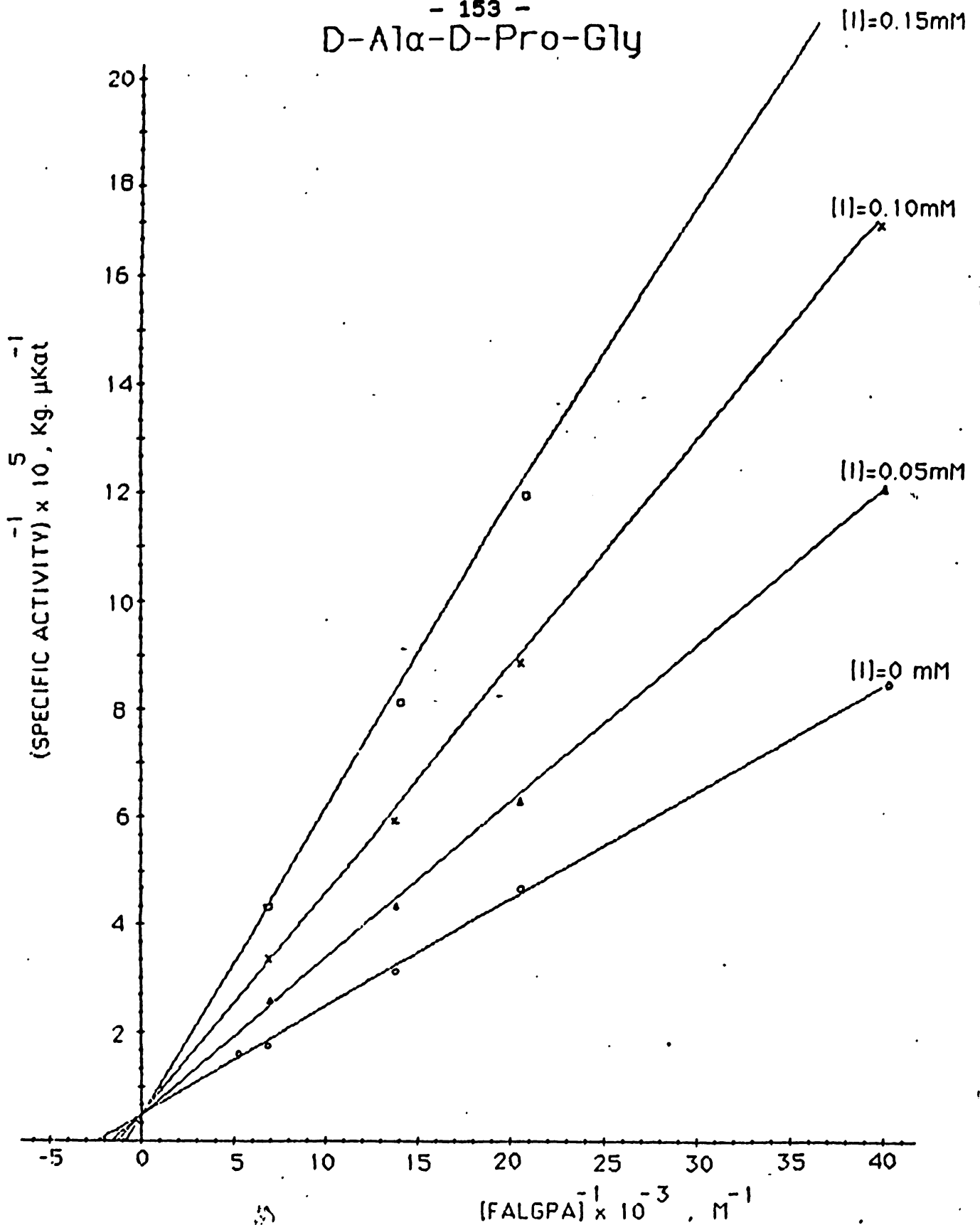
Πίνακας 16. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>α</sub>) και (DA<sub>β</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.100x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του D-Ala-D-Pro-Gly.

[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(ΔA) <sub>α</sub> : (ΔA) <sub>β</sub> : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kq·l·κατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>α</sub> : (ΔA) <sub>β</sub> : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kq·l·κατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>α</sub> : (ΔA) <sub>β</sub> : (SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kq·l·κατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.048 : 0.008 : 12.04	0.061 : 0.007 : 16.90	0.058 : 0.005 : 23.09
0.050	20.00	0.115 : 0.018 : 6.25	0.124 : 0.014 : 8.77	0.119 : 0.010 : 11.85
0.075	13.33	0.177 : 0.027 : 4.25	0.192 : 0.021 : 5.88	0.200 : 0.016 : 8.05
0.150	6.66	0.034 : 0.004 : 2.50	0.050 : 0.005 : 3.31	0.050 : 0.004 : 4.17

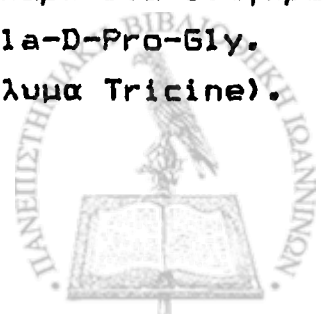
\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

1  
2  
5  
1

- 153 -  
D-Ala-D-Pro-Gly



Σχήμα 65. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της *Clostridium* κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Ala-D-Pro-Gly. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



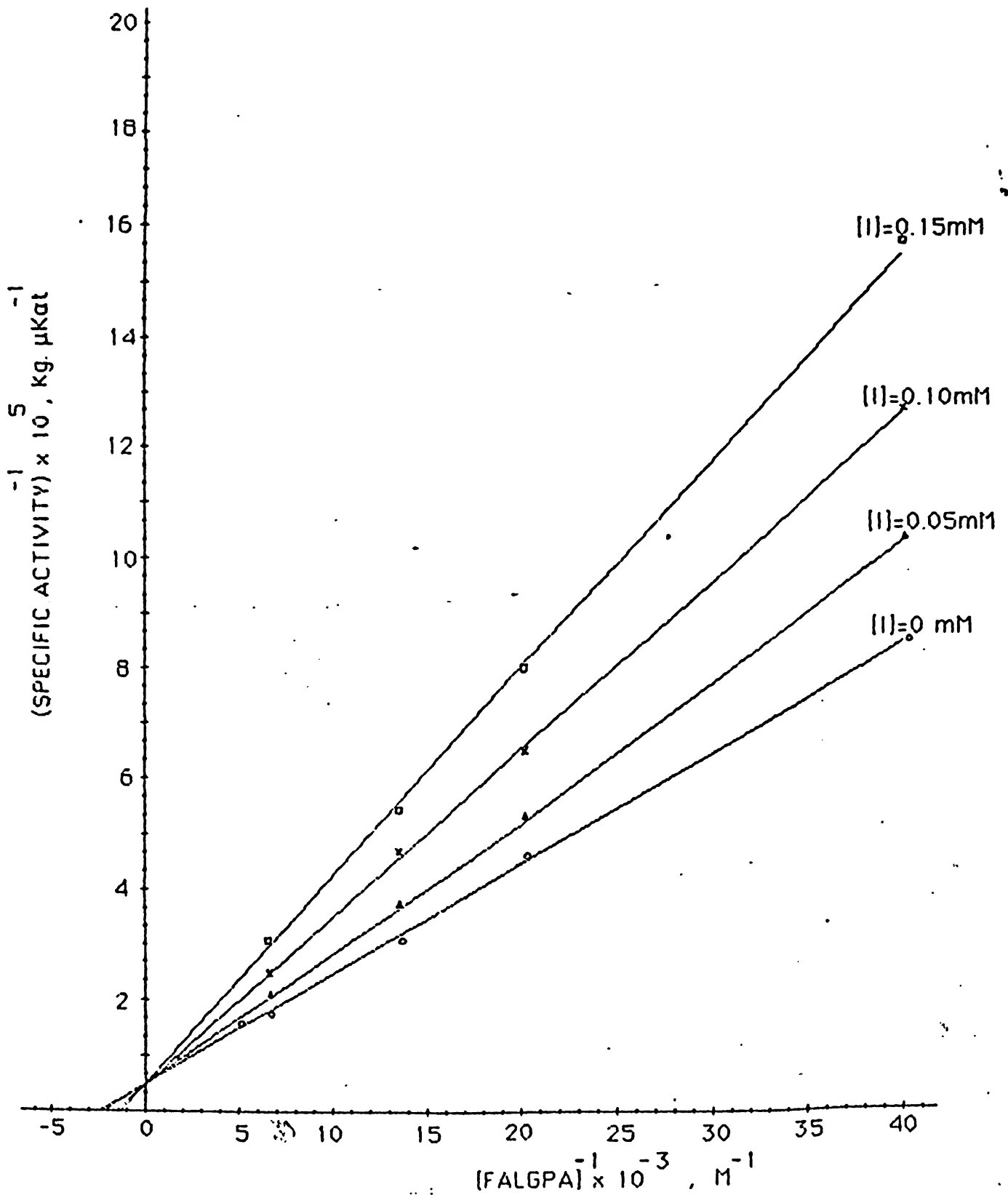


Πίνακας 17. Μεταβολή της απορρόφησης (ΔΑ<sub>αλ</sub>) και (ΔΑ<sub>βλ</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]=0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>]=0.100x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup> του D-Pro-L-Ser.

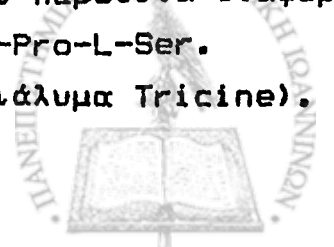
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·h)	(ΔΑ) <sub>αλ</sub> : (ΔΑ) <sub>βλ</sub> : (SPECIFIC #) : : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κρημκατ <sup>-1</sup> )	(ΔΑ) <sub>αλ</sub> : (ΔΑ) <sub>βλ</sub> : (SPECIFIC #) : : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κρημκατ <sup>-1</sup> )	(ΔΑ) <sub>αλ</sub> : (ΔΑ) <sub>βλ</sub> : (SPECIFIC #) : : (ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> : : (Κρημκατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.077 : 0.015 : 10.31	0.057 : 0.009 : 12.59	0.063 : 0.008 : 15.68
0.050	20.00	0.162 : 0.030 : 5.34	0.131 : 0.020 : 6.55	0.137 : 0.017 : 8.00
0.075	13.33	0.235 : 0.041 : 3.78	0.215 : 0.031 : 4.60	0.230 : 0.028 : 5.47
0.150	6.66	0.052 : 0.008 : 2.15	0.055 : 0.007 : 2.43	0.057 : 0.005 : 3.15

\* SPECIFIC ACTIVITY = ειδική ενεργότητα

# D-Pro-L-Ser



Σχήμα 66. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Pro-L-Ser. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).





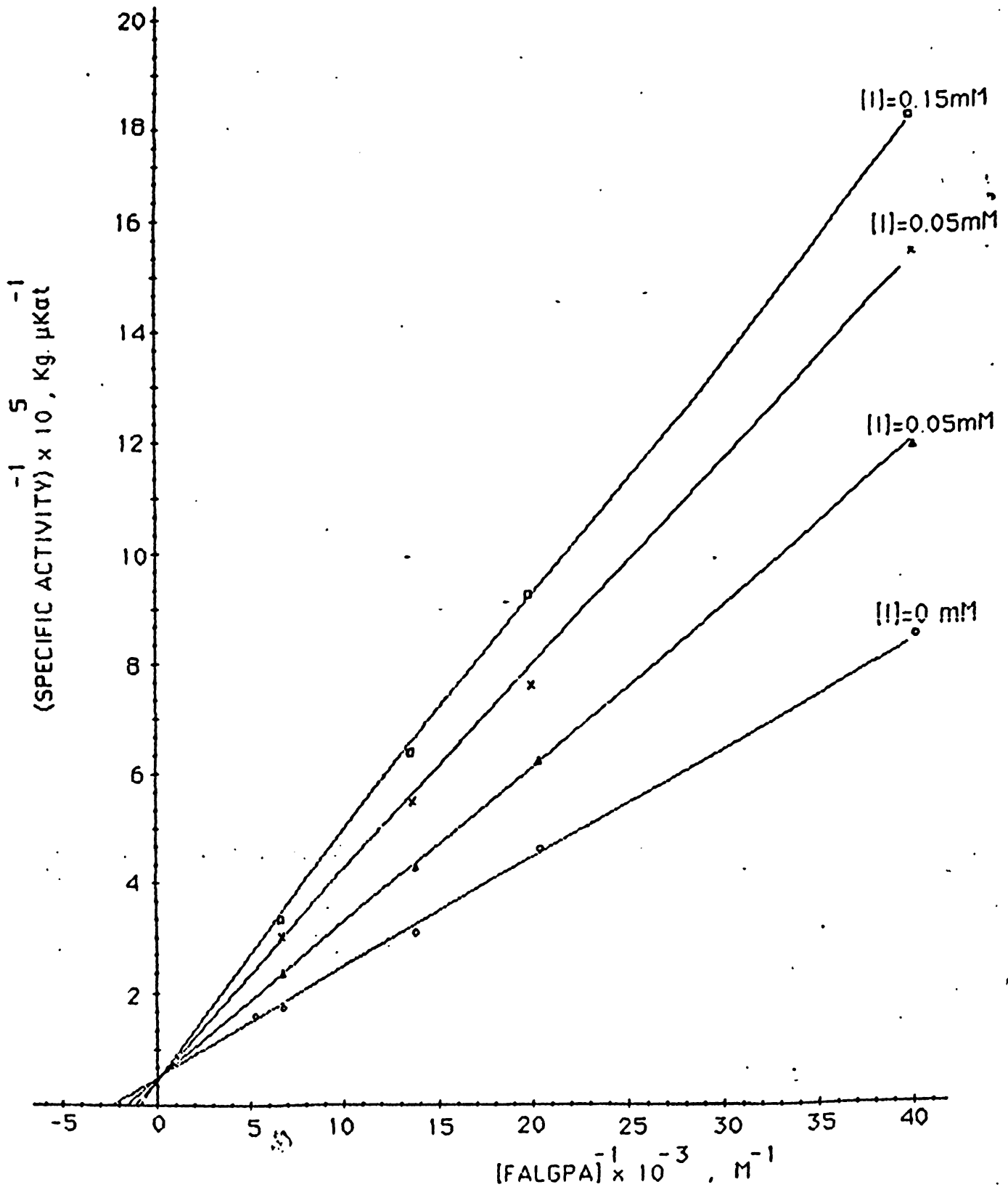
Πίνακας 18. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>αλ</sub>) και (DA<sub>ιοα</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.050 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.100x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.150x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του D-Ala-D-Pro-L-Ser.

[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.050x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.100x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.150x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # (Kgr·Kat <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # (Kgr·Kat <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # : (ΔA) <sub>αλ</sub> : (ΔA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC # (Kgr·Kat <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.038 : 0.006 : 11.90	0.054 : 0.007 : 15.39	0.050 : 0.005 : 18.10
0.050	20.00	0.086 : 0.014 : 6.15	0.113 : 0.014 : 6.41	0.121 : 0.013 : 9.17
0.075	13.33	0.161 : 0.025 : 4.27	0.200 : 0.024 : 5.55	0.185 : 0.019 : 6.36
0.150	6.66	0.051 : 0.007 : 2.27	0.048 : 0.008 : 2.94	0.062 : 0.006 : 3.32

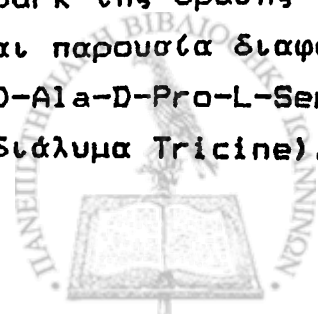
\* SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

1  
15  
1

# D-Ala-D-Pro-L-Ser



Σχήμα 67. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Ala-D-Pro-L-Ser. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



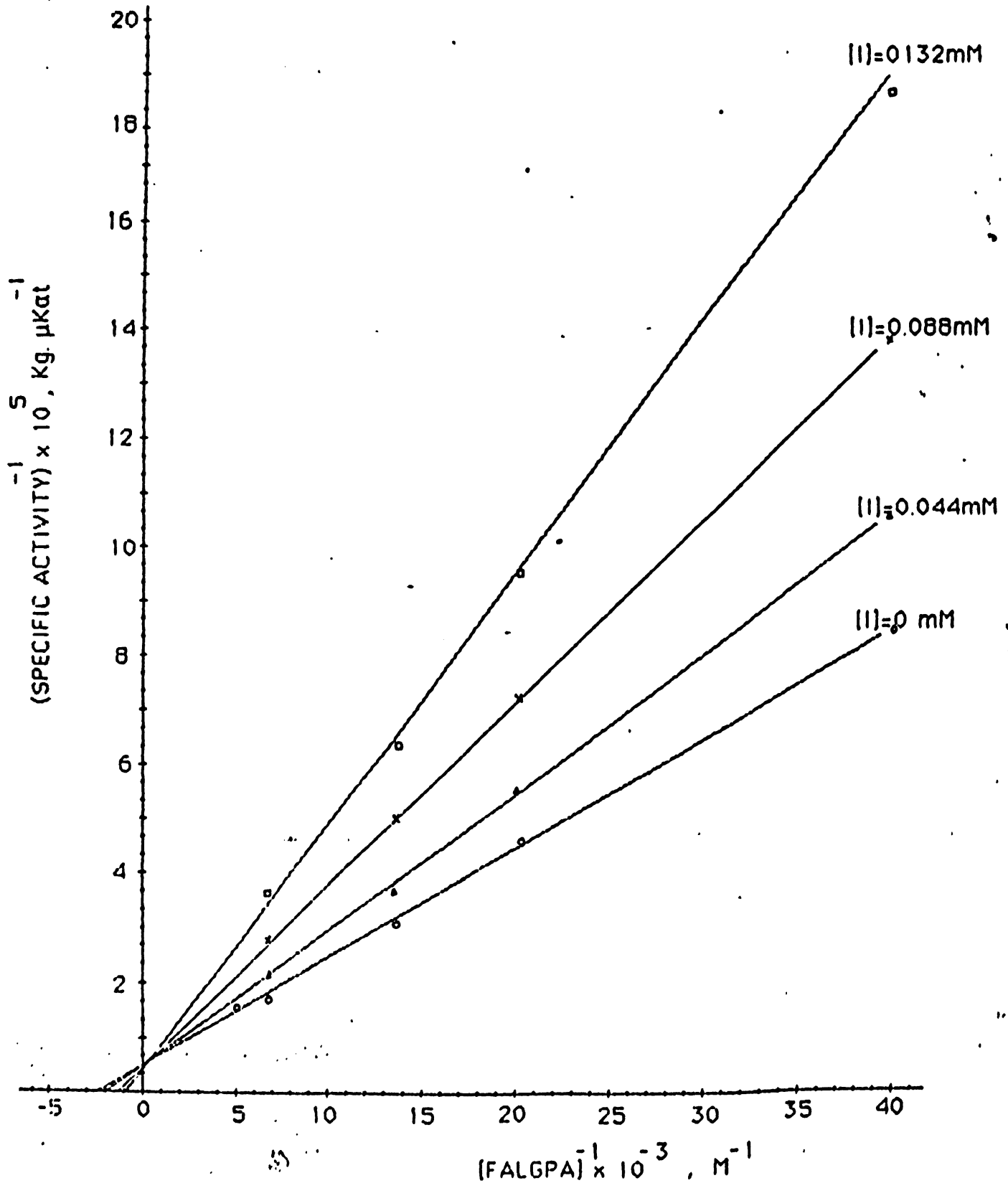


Πίνακας 19. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>αλ</sub>) και (DA<sub>ιοκ</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup>, και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]= 0.044 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.088x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.132x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του L-Pro-L-Cys.

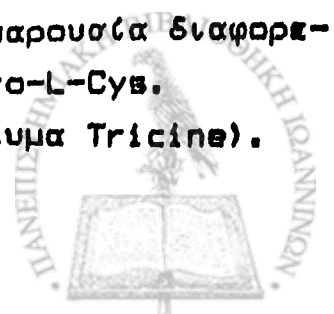
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.044x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.088x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.132x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (K <sub>απμ</sub> κατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (K <sub>απμ</sub> κατ <sup>-1</sup> )	(ΔA) <sub>αλ</sub> : : (ΔA) <sub>ιοκ</sub> : : (SPECIFIC # ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (K <sub>απμ</sub> κατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.063 : 0.012 : 10.53	0.062 : 0.009 : 13.71	0.068 : 0.007 : 18.50
0.050	20.00	0.132 : 0.024 : 5.49	0.136 : 0.019 : 7.14	0.115 : 0.012 : 9.40
0.075	13.33	0.190 : 0.027 : 3.85	0.178 : 0.024 : 4.90	0.238 : 0.025 : 6.35
0.150	6.66	0.050 : 0.008 : 2.17	0.053 : 0.006 : 2.71	0.059 : 0.006 : 3.57

\* SPECIFIC ACTIVITY = ειδική ενεργότητα

### L-Pro-L-Gys



**Σχήμα 68.** Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα L-Pro-L-Cys. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



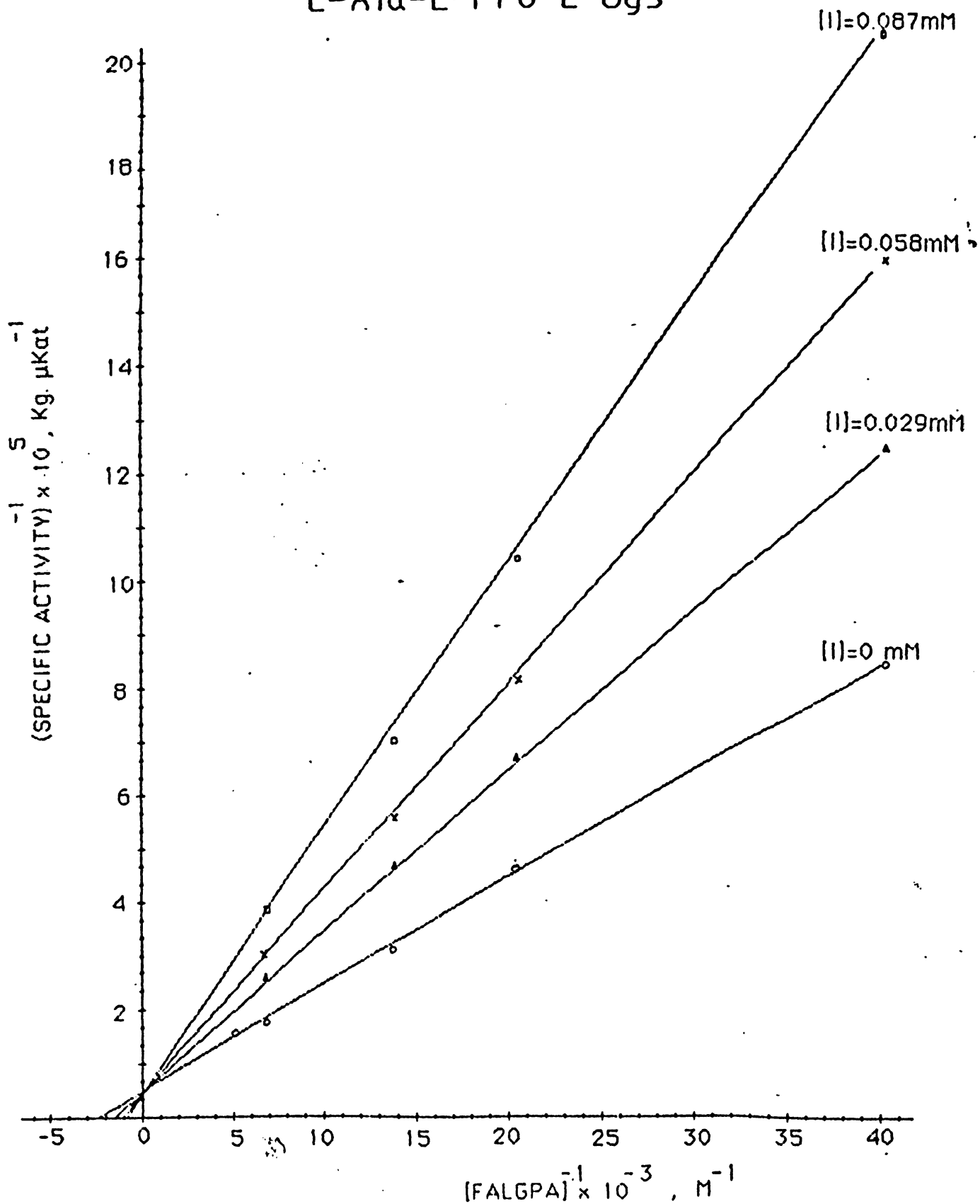


Πίνακας 20. Μεταβολή της απορρόφησης (DA<sub>αα</sub>) και (DA<sub>ιοα</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περίοχη συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]=0.029 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>] = 0.058x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.087x10<sup>-3</sup>mol·l<sup>-1</sup> του L-Ala-L-Pro-L-Cys.

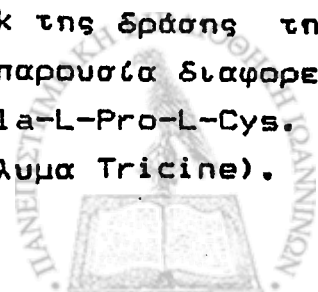
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.029x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.058x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.087x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FALGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FALGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(DA) <sub>αα</sub> : (DA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgr·l·κατ <sup>-1</sup> )	(DA) <sub>αα</sub> : (DA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgr·l·κατ <sup>-1</sup> )	(DA) <sub>αα</sub> : (DA) <sub>ιοα</sub> : (SPECIFIC ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kgr·l·κατ <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.068 : 0.011 : 12.34	0.063 : 0.008 : 15.78	0.070 : 0.007 : 20.40
0.050	20.00	0.155 : 0.024 : 6.40	0.152 : 0.018 : 8.13	0.140 : 0.013 : 10.30
0.075	13.33	0.219 : 0.032 : 4.50	0.199 : 0.024 : 5.52	0.208 : 0.020 : 6.90
0.150	6.66	0.050 : 0.007 : 2.46	0.052 : 0.006 : 2.99	0.050 : 0.004 : 3.69

SPEIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

### L-Ala-L-Pro-L-Gys



Σχήμα 69. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της Clostridium κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα L-Ala-L-Pro-L-Cys. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).





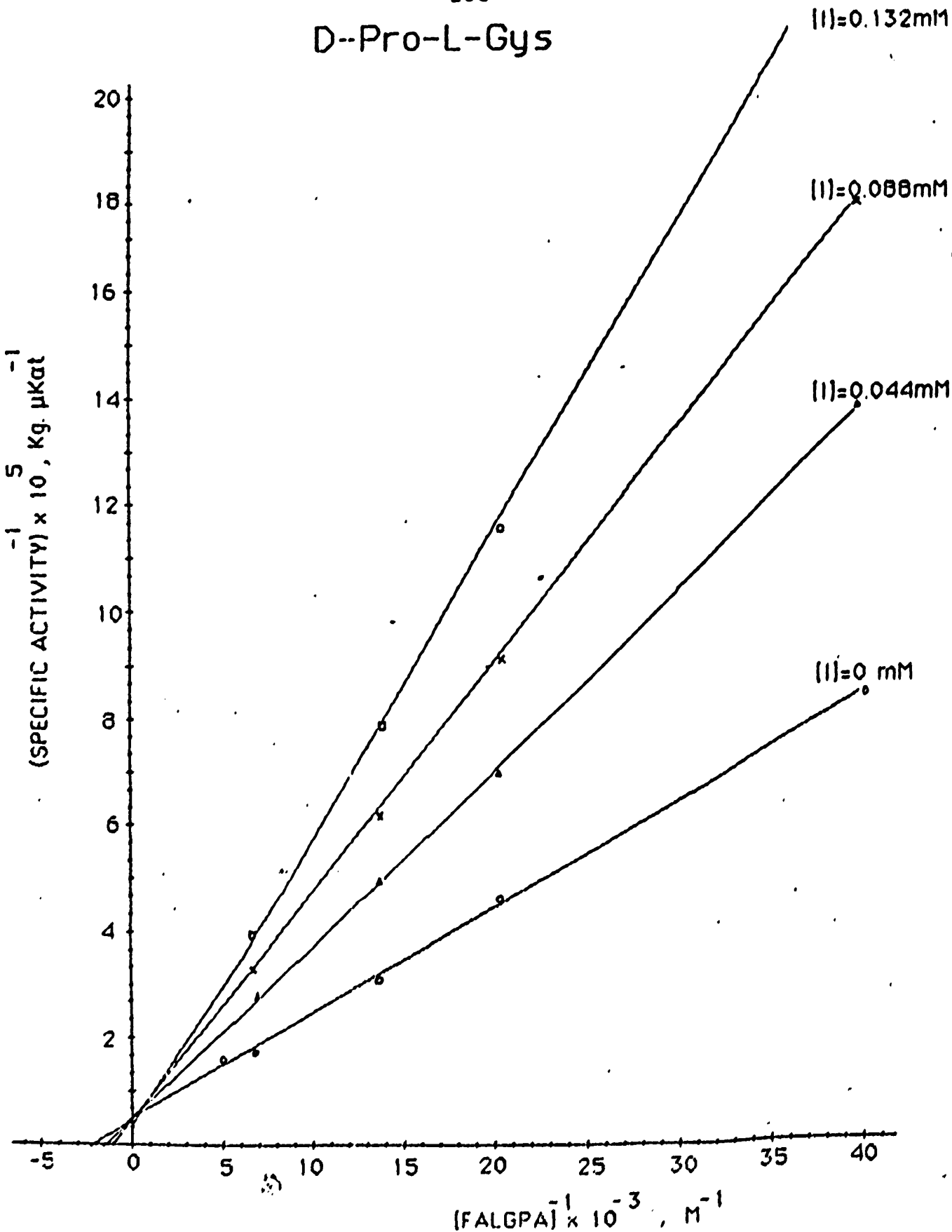


Πίνακας 21. Μεταβολή της απορρόφησης (D<sub>A=λ</sub>) και (D<sub>A10λ</sub>) σε μήκος κύματος λ=324nm και λ=345nm, για την περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος [S]=0.025-0.150 mol·l<sup>-1</sup> και για συγκεντρώσεις αναστολέα [I<sub>1</sub>]=0.045 x 10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>2</sub>]=0.087x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup>, [I<sub>3</sub>]=0.132x10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup> του D-Pro-L-Cys.

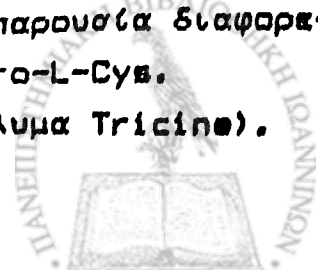
[S]	[S] <sup>-1</sup>	[I <sub>1</sub> ]=0.044x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>2</sub> ]=0.088x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[I <sub>3</sub> ]=0.132x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )
[FAIGPA]x10 <sup>-3</sup> (mol·l <sup>-1</sup> )	[FAIGPA] <sup>-1</sup> x10 <sup>3</sup> (mol <sup>-1</sup> ·l)	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : : : : : : :	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : : : : : : :	(ΔA) <sub>εξ</sub> : : : : : : : :
		(SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μKat <sup>-1</sup> )	(SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μKat <sup>-1</sup> )	(SPECIFIC * ACTIV.) <sup>-1</sup> x10 <sup>-5</sup> (Kg·μKat <sup>-1</sup> )
0.025	40.00	0.052 : 0.008 : 13.70	0.078 : 0.009 : 17.90	0.045 : 0.004 : 22.53
0.050	20.00	0.110 : 0.016 : 6.99	0.123 : 0.014 : 9.10	0.116 : 0.010 : 11.55
0.075	13.33	0.198 : 0.027 : 4.90	0.171 : 0.019 : 6.18	0.203 : 0.017 : 7.93
0.150	6.66	0.037 : 0.005 : 2.73	0.057 : 0.006 : 3.30	0.053 : 0.005 : 4.00

SPECIFIC ACTIVITY - ειδική ενεργότητα

### D-Pro-L-Gys



Σχήμα 70. Γραφική παράσταση κατά Lineweaver-Burk της δράσης της *Clostridium* κολλαγενάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα D-Pro-L-Cys. (Υπόστρωμα "FALGPA" σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine).



## ΧΙ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχοντας υπόψη τα δεδομένα άλλων ερευνητών που αναφέρονται στην αναστολή των κολλαγενασών, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε μια σειρά τριπεπτιδίων του γενικού τύπου D-Ala-D-Pro-X όπου X=Gly, L-Asp, L-Ser και L-Cys και του τύπου L-Ala-L-Pro-X όπου X=L-Asp και L-Cys, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα διπεπτίδια, δηλ. χωρίς την -D- ή L-Ala.

Η κινητική μελέτη αναστολής των προαναφερθέντων πεπτιδίων μας έδωσε τη δυνατότητα να διερευνήσουμε το βαθμό σύμπλεξης του  $Zn^{++}$  με ομάδες όπως υδρόξυλο-, καρβόξυλο- και σουλφουδρυλυμάδα καθώς επίσης και τη διαφοροποίηση στη συμπλεκτική ικανότητα που παρουσιάζεται μεταξύ διαστερεοϊσομερών πεπτιδίων τα οποία συμπλέκονται με το ένζυμο κατά ένα *retro-inverso* ή απλώς *retro* τρόπο. Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών (Πίνακας 22) προκύπτει ότι:

1) Τα τριπεπτίδια είναι γενικά ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα διπεπτίδια (με εξαίρεση τα πεπτίδια που περιέχουν στην  $P_1'$  θέση ασπαρτικό και για τα οποία θα αναφερθούμε παρακάτω) γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της  $S_3'$  υποπεριοχής του ενζύμου και του  $P_3'$  αμινοξέος και που συμφωνεί απόλυτα με ήδη υπάρχουσα συμπεράσματα άλλων ερευνητών.

2) Τα πεπτίδια με D-αμινοξέα είναι ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα με L-αμινοξέα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική μας ιδέα, ότι για να πραγματοποιηθεί ο καλλίτερος προσανατολισμός του αναστολέα σε σχέση με το ένζυμο, απαιτείται η αλλαγή της στερεοχημικής διάταξης όλων των αμινοξέων (από -L- σε -D-), εκτός πιθανόν του πρώτου που αντιστοιχεί στην  $S_1'$  υποπεριοχή του ενζύμου.

3) Η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  με τον αναστολέα πιθανόν να πραγματοποιείται μέσω της  $\alpha'$ -COOH-ομάδας του  $P_1'$  αμινοξέος (σχήμα 2) ή μέσω της παράπλευρης αλυσίδας του ίδιου αμινοξέος (σχήμα 1).

Εάν η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  με τον αναστολέα πραγματοποιείται μέσω της  $\alpha$ -COOH (σχήμα 2) οι πεπτιδικοί δεσμοί του αναστολέα πιθανόν να μετατοπίζονται κατά μια θέση προς τα αριστερά



σε σχέση με τους πεπτιδικούς δεσμούς του υποστρώματος. Συγχρό-  
νως οι παράπλευρες ομάδες διατηρούν την κατάλληλη χωροδιάταξη  
γεγονός που επιτυγχάνεται με επιλογή αμινοξέων D-στεreoχημικής  
διάταξης. Η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  με την  $\alpha'$ -COOH-ομάδα του  $P_1'$   
αμινοξέος του αναστολέα πιθανόν να ενισχύεται από την παρά-  
πλευρη ομάδα του ίδιου αμινοξέος, με αποτέλεσμα ο  $Zn^{++}$  να σχη-  
ματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο με δύο περιφερειακούς υποκαταστά-  
τες επί του μορίου του ενζύμου και δύο επί του μορίου του  
αναστολέα.

Η δημιουργία του τετραεδρικού αυτού συμπλόκου μεταξύ  
ενζύμου και αναστολέα θα έχει ως αποτέλεσμα τα πεπτίδια που  
περιέχουν στην  $P_1'$  θέση L-Cys, L-Asp και L-Ser να παρουσιάζουν  
ισχυρή συμπλεκτική ικανότητα, λόγω του ότι όλα αυτά τα  
αμινοξέα περιέχουν στην παράπλευρη αλυσίδα τους άτομο οξυγόνου  
ή θείου που μπορεί να δράσει σαν δότης ηλεκτρονίων. Αντίθετα ο  
αναστολέας που περιέχει Gly στην  $P_1'$  θέση θα πρέπει να παρου-  
σιάζει μικρότερη συμπλεκτική ικανότητα εφ' όσον ως παράπλευρη  
αλυσίδα η "Gly" φέρει απλά ένα άτομο υδρογόνου. Από τα  
αποτελέσματα όμως του Πίνακα 22 παρατηρούμε ότι όχι μόνο τα  
πεπτίδια της "Gly" δεν είναι ασθενέστεροι αναστολείς από τα  
αντίστοιχα της "Ser" αλλά παρουσιάζουν περίπου την ίδια, αν  
όχι καλλίτερη, συμπλεκτική ικανότητα με τα αντίστοιχα πεπτίδια  
του "Asp", τα οποία λογικά θα έπρεπε να είναι ισχυρότεροι  
αναστολείς αφού διαθέτουν δύο -COOH-ομάδες για σύμπλεξη.

Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδηγούν στο συμπέρασμα, πάντα  
βέβαια με κάποια επιφύλαξη ότι δεν θα πρέπει να ευνοείται η  
δημιουργία τετραεδρικού συμπλόκου, πιθανόν λόγω μη κατάλληλου  
προσανατολισμού της παράπλευρης αλυσίδας του  $P_1'$  αμινοξέος σε  
σχέση με τον  $Zn^{++}$ . Περαιτέρω πειράματα που θα μπορούσαν  
μελλοντικά να γίνουν προς αυτή την κατεύθυνση, είναι η σύνθεση  
τριπεπτιδίων με D-αμινοξέα και στην  $P_1'$  θέση, ώστε να  
διαπιστωθεί αν η αλλαγή της στεreoχημικής διάταξης και του  $P_1'$   
αμινοξέος (από -L- σε -D-) ευνοεί τη δημιουργία τετραεδρικού  
συμπλόκου με τον  $Zn^{++}$  ή όχι.



Αν η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  με τον αναστολέα πραγματοποιείται μέσω της παράπλευρης αλυσίδας οι πεπτιδικοί δεσμοί του αναστολέα που περιέχουν "Asp" ( $C_1$  σχ.1) συμπλήτουν με τους πεπτιδικούς δεσμούς του υποστρώματος, ενώ αντίθετα οι πεπτιδικοί δεσμοί όλων των άλλων αμινοξέων πιθανόν να είναι μετατοπισμένοι κατά μία θέση προς τα αριστερά ( $C_{2,3,4}$  σχ.1). Οι στερεοχημικές απαιτήσεις της υποπεριοχής  $S_1'$  ικανοποιούνται καθ'όσον πράγματι υπάρχει ένα άτομο υδρογόνου διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με την  $S_1'$  υποπεριοχή του ενζύμου. Το άτομο αυτό υδρογόνου προέρχεται είτε από το N-H του  $P_1'$  αμινοξέος είτε από το C<sup>α</sup>-H του ίδιου αμινοξέος.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 επίσης παρατηρούμε ότι υπάρχει μία βαθμιαία ελάττωση της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων που περιέχουν στην  $P_1'$  θέση Cys, Asp, Gly και Ser, γεγονός που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με ήδη υπάρχοντα πειραματικά αποτελέσματα πάνω σε μεταλλοένζυμα άλλων ερευνητών και οι οποίοι αναφέρουν ότι η -SH-ομάδα προσφέρεται καλλίτερα για σύμπλεξη με τον  $Zn^{++}$  απ'ότι το -COOH, ομοίως δε και η -COOH-ομάδα καλλίτερα από την -OH-ομάδα. Με βάση λοιπόν αυτή την παρατήρηση και δεχόμενοι συγχρόνως ότι η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  πραγματοποιείται μέσω της παράπλευρης αλυσίδας του  $P_1'$  αμινοξέος, ίσως πλησιάζουμε στην απάντηση του ερωτήματος γιατί τα πεπτιδία της "Cys" και του "Asp" είναι ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα της "Ser".

Τέλος ένα άλλο ερώτημα αφορά τα πεπτιδία του "Asp" και συγκεκριμένα ποιά από τις δύο COOH-ομάδες του Asp (α ή β) συμπλέκεται με τον  $Zn^{++}$ . Στο ερώτημα αυτό με τα μέχρι τώρα πειράματα δεν μπορούμε να απαντήσουμε, παρ'όλα αυτά όμως μια σειρά νέων πειραμάτων, όπως εκλεκτική δέσμευση των COOH-ομάδων (π.χ. εστεροποίηση του α ή β-COOH) θα μας βοηθήσουν να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα και επί πλέον να κατανοήσουμε καλλίτερα τον τρόπο σύμπλεξης ενζύμου-αναστολέα.

Με βάση όλες αυτές τις παρατηρήσεις πιθανόν στα πεπτιδία που περιέχουν στην  $P_1'$  θέση "Ser" ή "Gly" η σύμπλεξη να πραγματοποιείται μέσω της α-COOH-ομάδας,, ενώ στα πεπτιδία που



περιέχουν στην ίδια θέση "Cys" είναι πιθανότερο η σύμπλεξη να πραγματοποιείται μέσω της παράπλευρης αλυσίδας. Θα ήταν όμως πράγματι αξιόλογο αν μελλοντικά η προσπάθεια αυτή συνεχιζόταν με μία σειρά νέων πειραμάτων όπως π.χ. η εκλεκτική δέσμευση του  $\alpha$ -COOH της Cys ή της Ser, ώστε να διευκρινισθεί πλήρως ο ρόλος του  $\alpha$ -COOH των αμινοξέων αυτών, όσον αφορά τη συμπλεκτική ικανότητα των αντίστοιχων πεπτιδίων.



## Χ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Α) Η παρούσα εργασία αφορά τη σύνθεση και κινητική μελέτη αναστολέων της *Clostridium histolyticum* κολλαγενάσης και περιλαμβάνει δύο μέρη: το πρώτο μέρος (θεωρητικό) το οποίο περιλαμβάνει τα κεφάλαια I-VIII και το δεύτερο μέρος (πειραματικό: κινητικές μελέτες και ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών) στο οποίο υπάγονται τα κεφάλαια IX-XI .

Β) Στο κεφάλαιο I γίνεται μία γενική εισαγωγή επί των ενζύμων με ιδιαίτερη προσοχή στο ρόλο αυτών στην αυτορύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας. Αναφέρονται επίσης ορισμένες βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζύμων οι οποίες θεμελιώνουν την πολύπλευρη σημασία τους στη δημιουργία, διατήρηση και βελτίωση των συνθηκών ζωής κάθε ζωντανού οργανισμού.

Γ) Στο κεφάλαιο II εξετάζονται τα ένζυμα από φυσικοχημικής πλευράς. Αναλύεται έτσι, αφ' ενός μέρους η επίδραση των ενζύμων πάνω στην ενέργεια ενεργοποίησης κάθε ενζυμικής αντίδρασης, αφ' ετέρου δε ο ρόλος "κλειδί" των ενζύμων πάνω στην ενεργειακή σύζευξη αναβολισμού και καταβολισμού που αποτελεί και τη θεμελιώδη λειτουργία της ζωής.

Δ) Στο κεφάλαιο III περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού και γίνεται εκτεταμένη αναφορά στη δευτεροταγή σύνταξη των πεπτιδίων. Δίνονται σε ένα βαθμό οι παράγοντες που καθορίζουν την δευτεροταγή σύνταξη, καθώς και η επίδραση του περιβάλλοντος μέσου (pH, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία) πάνω στη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου.

Ε) Στο κεφάλαιο IV αναφέρονται οι βασικές θεωρίες που αφορούν τον τρόπο σύμπλεξης ενζύμου-υποστρώματος καθώς επίσης και ορισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και μελέτη των υποπεριοχών του ενζύμου. Επίσης γίνεται μια μικρή αναφορά στα αλλοστερικά ένζυμα και αμέσως μετά αναπτύσσεται η εξειδίκευση που παρουσιάζουν τα ένζυμα.

ΣΤ) Στο κεφάλαιο V δίνονται οι βασικές αρχές που διέπουν την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, καθώς και οι παράγοντες (θερμοκρασία, pH,) που επηρεάζουν την ταχύτητα αυτών. Επίσης αναλύονται μέθοδοι γραφικής απεικόνισης των ενζυμικών κινητικών δεδομένων.



Z) Στο κεφάλαιο VI εξετάζονται οι κυριώτεροι τύποι ενζυμικής αναστολής και δίνονται οι αντίστοιχες γραφικές απεικονίσεις. Επίσης αναφέρονται οι γενικές αρχές σχεδιασμού ενός αναστολέα, οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα μια σημαντική εξέλιξη στη σύνθεση νέων ισχυρών αναστολέων.

H) Στο κεφάλαιο VII παρατίθεται μια σύντομη ανασκόπηση των δομών, της ενζυμικής δράσης και των αναστολέων των κολλαγενάσων.

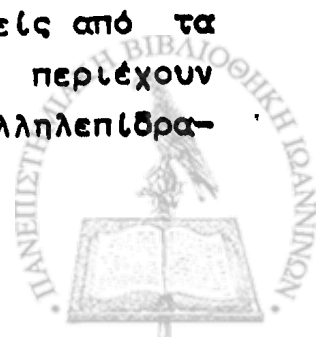
θ) Στο κεφάλαιο VIII περιγράφονται ορισμένες βασικές μέθοδοι σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση, καθώς και σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Αναφέρονται οι γενικές αρχές των δύο αυτών μεθόδων καθώς και τα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπισθούν ώστε να έχουμε πλήρη επιτυχία στη σύνθεση πεπτιδίων. Επίσης γίνεται μια σύντομη αναφορά για τη φύση και τη χρησιμότητα των RETRO-INVERSO πεπτιδίων.

I) Με το κεφάλαιο IX αρχίζει το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής, στο οποίο περιγράφεται η σύνθεση των πεπτιδίων που επιλέξαμε να δράσουν σαν αναστολείς της Clostridium κολλαγενάσης και που είναι του γενικού τύπου D-Ala-D-Pro-X όπου X=L-Asp, Gly, L-Ser, L-Cys, καθώς και του τύπου L-Ala-L-Pro-X όπου X=L-Asp, L-Cys. Στη συνέχεια αναφέρεται λεπτομερώς η μεθοδολογία την οποία ακολουθήσαμε για τον προσδιορισμό των κινητικών δεδομένων Km και K<sub>i</sub> της Clostridium κολλαγενάσης με την τεχνική της ηλεκτρονιακής φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού φωτός (UV-Vis).

IA) Στο κεφάλαιο X αναφέρονται τα αποτελέσματα της ηλεκτρονιακής φασματοσκοπίας βάσει των οποίων υπολογίζονται, αφ' ενός μόν οι κινητικές παράμετροι Km και V<sub>max</sub> του υπό υδρόλυση υποστρώματος "FALGPA" από την κολλαγενάση, αφ'ετέρου δε οι σταθερές αναστολής K<sub>i</sub> όλων των προαναφερθέντων πεπτιδίων.

IB) Στο κεφάλαιο XI αναφέρονται τα συμπεράσματα αυτής της εργασίας, τα οποία είναι τα εξής:

1) Τα τριπεπίδια είναι γενικά ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα διπεπίδια (με εξαίρεση τα πεπτιδια που περιέχουν ασπαρτικό) γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία της αλληλεπίδρα-





σης μεταξύ της  $S_2'$  υποπεριοχής του ενζύμου και του  $P_2'$  αμινοξέος και που συμφωνεί απόλυτα με ήδη υπάρχουσα συμπεράσματα άλλων ερευνητών.

2) Τα πεπτιδία με D-αμινοξέα είναι ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντιστοιχα με L-αμινοξέα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική μας ιδέα, ότι για να πραγματοποιηθεί ο καλλίτερος προσανατολισμός του αναστολέα σε σχέση με το ένζυμο, απαιτείται η αλλαγή της στερεοχημικής διάταξης όλων των αμινοξέων (από -L- σε -D-), εκτός πιθανόν του πρώτου που αντιστοιχεί στην  $S_1'$  υποπεριοχή του ενζύμου.

3) Η σύμπλεξη του  $Zn^{++}$  με τον αναστολέα πιθανόν να πραγματοποιείται μέσω της  $\alpha'$ -COOH-ομάδας του  $P_1'$  αμινοξέος (σχήμα 2) ή μέσω της παράπλευρης αλυσίδας του ίδιου αμινοξέος (σχήμα 1).

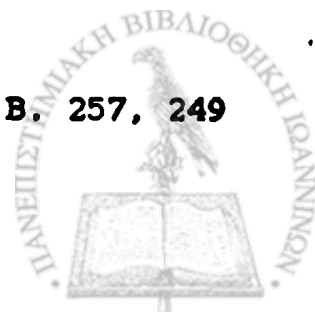


## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

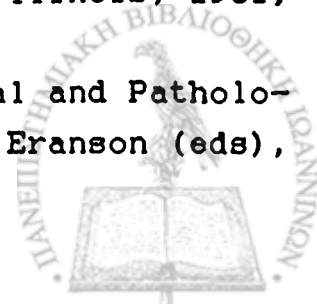
1. A.J.Barrett, Agents Actions 8,11-18 (1978).
2. T.M.S.Chang, Enzyme 229, 117 (1971).
3. G.Corrieu, H.Blashere, A.Ramirez I.N.S.A Toulouse, B. Du-teurtre and M.Moll Fifth International Fermentation Sumpo-sium, Berlin, 1976 p.294.
4. D.T.Elmore, "Peptides and Proteins", Cambridge Universite Press, London, 1968.
5. G.E.Schulz and R.H. Schirmer, "Principles of protein stru-cture" Springer - Verlag, New York, 1979.
6. W.T.Astbury and H.J.Woods, Phil. Trans Roy. Soc. (London) A 232, 333 (1933).
7. L.Pauling and R.B Corey, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.37, 235 (1951).
8. L.Pauling and R.B.Corey, Proc.Natl.Acad, Sci. U.S. 39, 247 (1953).
9. A.Light "Proteins: Structure and Function", Prentice Hall, U.S.A. (1974).
10. W. Kauzmann in the Mechanism of Enzyme Action (W.D. Mc Elroy and B.Glass, eds), Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, p.70
11. Α. Τρακατέλλη, "Βιοχημεία" Τόμος Α', Μέρος 1, 2η έκδοση Θεσσαλονίκη (1980).
12. F.London, Z.Physik, Chem (B) 11, 222 (1931).
13. C.C.F.Blake, D.F.Koenig, G.A.Mair, A.C.T.North, D.C.Phil-lips and V.R.Sarma Nature 206, 757 (1965).
14. C.C.F.Blake, L.N.Johnson. G.A.Mair, A.C.T.North, D.C.Phil-lips and V.R. Sarma. Proc Roy Soc. (London) B 167, 378 (1967).
15. C.B.Anfinsen, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 28:439 (1963).
16. W.Ferdinand "The Enzyme Molecule" England (1976).
17. J.C.Kendrew, Science 139, 1259 (1963).
18. R.E.Dickerson and I.Geis: The structure and Action of Pro-teins, Harper and Row Publishers, Inc. N.Y. (1969).
19. J.W.Campbell et al in Nature 240, 137 (1972).



20. C.Tanford, Adv.Protein Chem., 24,1, (1970).
21. E.Fischer, Berichte 27, 2987 (1894).
22. A.J.Brown, Trans Chem. Soc. (Lond) 81, 373 (1902).
23. V.Henri, Acad.Sci.,Paris 135, 916 (1902); Lois generales de l'action des diastases, Herman (1903).
24. C.O'Sullivan and F.W.Tomson, J.Chem. Soc. (Lond.) 57, 834 (1890).
25. E.Racker J Biol.Chem. 177, 883 (1949).
26. P.J.G.Mann and B.Woolf, Biochem. J.24, 427 (1930).
27. H. Gutfreund, An Introduction to the study of Enzymes, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1965), p.142 ff.
28. L.C.Clarke, Trans.Am.Soc.Art.Int., 2,41, (1956).
29. W. Ferdinand "The Enzyme Molecule" England (1976).
30. A.M.Grestfield, W.H.Stein and S.Moore, J.Biol. Chem., 238, 2413 (1963).
31. L.Siegel and J.S.Ellison, Biochemistry, 10, 2856 (1971).
32. C.Milstein and F.Sanger, Biochem.J., 79,456 (1961).
33. B.L.Vallee and J.F.Riordan, A.Rev.Biochem., 38,733 (1969).
34. E.Show, M.Mares-Guia, and W.Coden, Ibid., 4, 2219 (1965).
35. D.E.Koshland, Adv.Enzymol., 22, 45 (1960).
36. D.E.Koshland and K.E.Neet, A.Rev.Biochem., 37, 359 (1968).
37. W.N.Lipscomb, G.N.Reeke, J.A.Hartsuck, F.A.Quiocho, and P.H. Bethge, Phil, Trans. R.Soc., B. 251, 177 (1970).
38. H.P.Kasserra and K.J.Laidler, Can.J.Chem., 47,4031 (1969).
39. R.W.Porter, M.O.Modebe and G.R.Stark, J. Biol. Chem., 244, 1846 (1969).
40. J.Monod, J.P.Changeux and F.J.Jakob Mol.Biol. 6,306 (1963)
41. D.E.Koshland and K.E.Neet "The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes" in Ann Rev.Biochem. 37,359 (1968).
42. J.G.Gerhart and A.B.Pardee, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 28, 491 (1963).
43. J.P.Changeux, J.C.Gerhart and H.K.Schachman, Biochemistry, 7, 531 (1968).
44. A.G.Ogston, Nature, 164, 180 (1949).
45. I.Schechter and A.Berger, Phil. Trans. R. Soc. B. 257, 249 (1970).

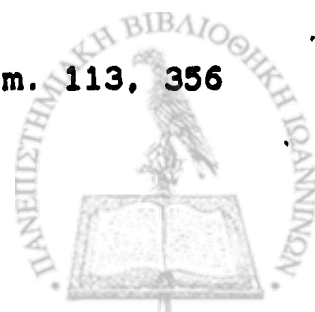


46. D. Atlas, S. Levit, I. Schechter and A. Berger, FEBS Lett., 11, 281 (1970).
47. W.K. Baumann, S.A. Bizzazaro and H. Dutler, FEBS Lett, 8, 257 (1970).
48. V. Henri, G.R. Acad. Sci., 133, 891 (1901).
49. L. Michaelis and M.L. Menten, Biochem. Z., 49, 333 (1913).
50. G.E. Briggs and J.B.S. Haldane, Biochem. J. 19, 338 (1925).
51. H. Lineweaver and D. Burk, J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
52. G.S. Hanes, Biochem. J. 26, 1406 (1932).
53. I.H. Segel "Enzyme kinetics" 1975, Ch 4.
54. K.J. Laidler and P. S. Bunting "The chemical kinetics of Enzyme action", Second Edition 1973, Ch 5.
55. G. Tammann, Z. Phys. Chem. 18, 426 (1895).
56. L. Michaelis and M.L. Menten, Biochem. Z 49, 333 (1913).
57. I.H. Segel "Enzyme kinetics", 1975, Ch. 3.
58. M. Dixon, Biochem. J. 55, 170 (1953).
59. M. A. Ondetti and D. W. Cushman Biopolym., 20, 2001-2010 (1981).
60. J. Rudinger (1971) in Drug Design, Ariens, E.J. Ed., Academic Press, New York, pp. 319-401.
61. H.S. Sheung, F. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo and D.W. Cushman, J. Biol. Chem. 255, 401-407 (1980).
62. R.G. Almquist, C. Van-Ru, M.E. Ellis and H.L. Johnson J. Med. Chem. 23 1392-1398 (1980).
63. Jr. J.A. Yankeelov, K. Fok and D.J. Carothers, J. Org. Chem. 42, 1623-1624 (1978).
64. D.H. Rich, E.T.O. Sun and E. Ulm, J. Med. Chem. 23, 27-31 (1980).
65. M.A. Ondetti, B. Rubin and D.W. Cushman Science 196, 441- 444 (1977).
66. J.C. Powers, A. Yasutake, N. Nishino, B.F. Cupton and C.M. Kam, in "Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, (Rich, D. H. and Gross E. Eds) Pierce Chemical Co., Rockford Illinois, 1981, pp. 391-399.
67. J.F. Woessner, Jr. in: "Collagenases in Normal and Pathological Connective Tissue", D.E. Woolley, J.J. Eranson (eds),

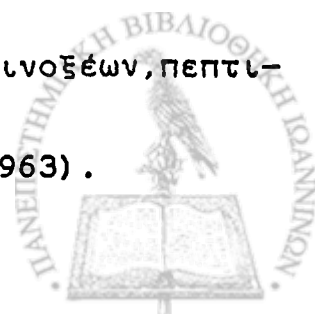


Wiley, p.223 (1980).

68. S.I.Brown, C.W.Hook, M.P.Tragakis: Invest Ophthalmol 11:149 (1972).
69. S.M.Krane: Ann Rheum Dis 40:433, 1981.
70. P.B.Robertson, J.Simpson: J.Periodontol 47:29 (1976).
71. L.A.Lotta, K.Tryggvason, S.Garbisa, P.G.Robey, Abe S:Nature 284:67 (1980).
72. M.C.Burleigh Proteinases in Mammalian Gells and Tissues (Barret A.J.Ed.) pp. 285-309 Elsevier/North Holland Biomedical Press New York (1977).
73. K.S.E. Cheah, Biochem. J. 229, 287-303 (1985).
74. M.B.Berman and R.Manabe, Ann. Ophthalmol., 5, 1193 (1973).
75. J.L.Seltzer, J.J. Jeffrey and A.Z. Eisen, Biochim. Biophys. Acta 485, 179 (1977).
76. R.Sugasawera and E.Harper, Biochemistry 23 5175-5181 (1984).
77. V.Keil-Dhouha Biochim. Biophys. Acta 429, 239-251 (1976).
78. S.Seifter and E.Harper, Enzymes (3rd Ed) 3, 649-697 (1971).
79. D.E.Wooley in Extracellular Matrix Biochemistry (K. Piez, and A.H.Reddi Eds) pp.119-158 Elsevier, New York (1984).
80. P.Christher, D.Damato, M.Reinhart and W.Abrams Biochemistry 21, 6005-6011 (1982).
81. D.R.Steinbrink, M.D.Bond and H.E. Van Wart, J. Biol. Chem. 260, 2771-2776 (1985).
82. A.Lecroisey, B.Keil, Biochem J. 179, 53 (1979).
83. J.S.Lwebuga-Mukasa, E.Harper and P.Taylor Biochemistry 15, 4736 (1976).
84. I.Emond and B.Keil FEBS lett. 77, 51-56 (1977).
85. F.Oppenheim and C.Franzblau Prep.Biochem. 8,387-407 (1978).
86. B.Keil Mol. Cell. Biochem. 23, 87-108 (1979).
87. E.Soru and Q.Zaharia, Enzymologia 43, 45-55 (1972).
88. M.D. Bond and H.E. Van Wart, Biochemistry 23, 3077-3085 (1984).
89. M.D. Bond and H.E. Van Wart, Biochemistry 23, 3085-3091 (1984).
90. H.E. Van Wart and D.R. Steinbrink Anal. Biochem. 113, 356 (1981).



91. E.Wunsch and H.Heidrich Z.Physiol Chem. 333,149-151 (1963)
92. Y. Nagai, S. Sakakibara, H. Nada and S. Akabori, Biochim. Biophys Acta 37, 567-569 (1960).
93. W. Grassmann and A. Nordwig Z. Physiol. Chem. 322, 267-272 (1960).
94. A.Galdes and B.L.Vallee "in Metal Ions in Biological Systems", Vol. 15, H.Sigel. Ed., Dekker, New York,p.1 (1982)
95. S.Safer and E.Harper Enzymes 3rd Ed. 3, 649-697 (1971).
96. H.E.Van Wart and D.R.Steinbrink Anal. Biochem 113, 356-365 (1981).
97. E.Harper and S.Seifter Isr. J.Chem. 12, 515-528 (1974).
98. R.E.Galardy, V. Kontoyiannidou-Ostrem and Z.P. Kontylewicz Biochemistry 22, 1990-1995 (1983).
99. E.D.Thorsett, E.E.Harris, E.R.Peterson, A.A.Patchett E.H. Ulm and T.C.Vassil, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79,2176-2180 (1982).
- 100.N.E.Jacobsen and P.A.Bartlett J.Am.Chem.Soc. 103 654-657 (1981).
- 101.M.Alstein, S.Blumberg and Z.Vogel Eur. J.Pharmacol 76,299-300 (1982).
- 102.R.E. Galardy and D. Grobelny, Biochemistry, 22, 4556-4561 (1983).
- 103.C.F.Vencill, D.Rasnick, K.V.Crumley, N.Nishino and J.C.Powers, Biochemistry 24, 3149-3157 (1985).
- 104.A.Yiotakis, V.Dive, M.Sakarellos-Daitsiotis, M.Monnot and S.Fernandjian. Peptides 1984 Proceedings of the 18<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Sewden, (1984).
- 105.A.Yiotakis and V.Dive, Eur. J.Biochem. 160, 413-418 (1986)
- 106.M.Bodanszky, Y.S.Klausner and M.A.Ondetti, Peptide Synthesis, Wiley, New York, 1976.
- 107.K.D.Kopple, "Peptides and Amino Acids", W.A.Benjamin, New York 1966.
- 108.M.Bergmann and L.Zervas, Ber. 65 1192 (1932).
- 109.L.A.Carpino, J.Amer.Chem.Soc. 79, 98 (1957).
- 110.I.Βουρβιδου-Φωτάκη, "Εισαγωγή στη Χημεία, αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών", 2η έκδ., Αθήνα, (1978).
- 111.R.B.Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963).



112. J. C. Sheehan, G. P. Hess, J. Amer. Chem. Soc., 77, 1067 (1955).
113. D. Stevenson and G. T. Young, Chem. Commun., 900 (1967) J. Chem. Soc., (c) 2389 (1969).
114. S. Sakakibara and Y. Shimonishi, Bull. Chem. Soc. Jap., 38, 1412 (1956).
115. M. M. Shemyakin, Y. A. Orchinnikov and V. T. Ivanov: Topochemical investigations on peptide systems. Angew. Chem. 8: 492-499 (1969).
116. V. Prelog and H. Gerlach Helv Chim Acta, 47, 2288 (1964).
117. M. Chorev, C. G. Willson and M. Goodman in "Peptides: Proceedings of the 5th American Peptide Symposium", M. Goodman and J. Meienhofer, Eds Wiley N.Y., 1977, p. 572.
118. M. Goodman and M. Chorev, "Accounts of Chemical Research, 12 1, (1979).
119. C. F. Morley, J. S. Eur. Pept. Symp. 13th, 1974, 1975, 287-297.
120. K. Vogler, P. Lanz, W. Lergier and W. Haefely, Helv. Chim. Acta 49, 390 (1966).
121. V. A. Najjar, German Patent 2124003 (Cl. C07C, Acik), June 22, (1972).
122. B. F. Gisin Helv. Chim. Acta, 56, Fasc. 5 (1973).
123. B. F. Gisin Anal Chim: Acta, 58 (1972).
124. G. L. Ellman Arch. Biochem. and Biophys, 74, 443 (1958).
125. G. L. Ellman Arch. Biochem and Biophys. 82, 70-77 (1959).
126. E. Schnobel, Liebings Ann. Chem., 702, 188 (1967).
127. I. Photaki, J. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis and L. Zervas. J. Chem. Soc. 2683-2687 (1970).
128. E. M. Papamichael "Least-Squares fitting of Tabular data to Rational functions, in BASIC" Analyst 112, pp. 815-819, (1987).



Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο με δαπάνη  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κ.Α. Πανεπιστημιακού Τυπογραφείου. ....

Τυπογράφος : Α. Τσιούρης

Copyright : Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Απαγορεύεται η μερική ή ολική ανατύπωση, καθώς και η  
λήψη φωτοαντιγράφων από το βιβλίο χωρίς τη γραπτή  
άδεια του Τμήματος Δημοσιευμάτων του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων και του συγγραφέα.

Διατίθεται και στο Βιβλιοπωλείο του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων, Δομπόλη, 451 10 Ιωάννινα τηλ. 21801.

