

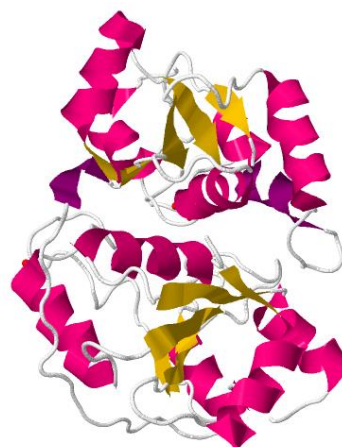
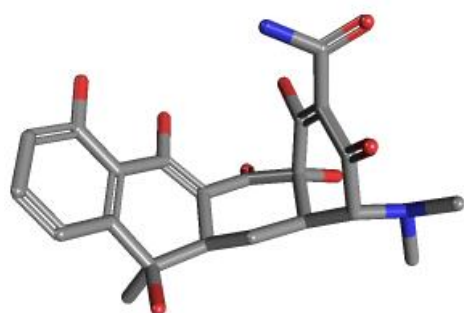


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ 3-ΜΕΡΚΑΠΤΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗΣ ΘΕΙΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ (3MST)



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΔΕ

ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή για το θέμα της εργασίας που μου ανέθεσε. Εκτιμώ δεόντως ότι μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ ερευνητικά με ένα αντικείμενο πέρα από τα όρια της Φαρμακολογίας, λαμβάνοντας υπόψιν του την αγάπη μου για τομείς συνδεδεμένους περισσότερο με τον κλάδο της Χημείας. Όπως συχνά και ο ίδιος υπενθυμίζει, δεν υπάρχει ένας τομέας με αυστηρά όρια που μπορούμε να επιλέξουμε στην έρευνα κι αυτό είναι συνάμα το δύσκολο και το όμορφο. Τον ευχαριστώ ακόμη για τις -χημικής φύσεως και όχι μόνο- συμβουλές, την ευφυή προσέγγισή του σε δυσνόητα αποτελέσματα που κλήθηκα να ερμηνεύσω, αλλά και για τη δυσπιστία του, που με έκανε να παλέψω περισσότερο για να αποδείξω τις σκέψεις μου. Θεωρώ τον εαυτό μου περισσότερο από τυχερό για αυτά που αποκόμισα εν τέλει από τη συνεργασία σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο και χαίρομαι ιδιαίτερα που η παιδική επιθυμία μου να ασχοληθώ με την έρευνα ξεκίνησε με αυτά τα ενδιαφέροντα επιστημονικά ερωτήματα.

Ευχαριστώ, επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ιωάννα Ανδρεάδου και τον Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό για τις γνώσεις, τις συμβουλές και την παρακίνησή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών, που με έκαναν να αγαπήσω και να συνταιριάξω την ερευνητική τους ενασχόληση στη συνέχιση των σπουδών μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Δρακούλη για τις διορθώσεις και τις συμβουλές του επί της διπλωματικής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά για την αμέριστη συμπαράστασή του σε όποιο πρόβλημα κι αν αντιμετώπισα, την καθοδήγησή του με αγάπη προς τους φοιτητές του και φυσικά, τη βασική έρευνα. Ο θαυμασμός μου για τον ίδιο και το εργαστήριό του είναι μεγάλος και αυταπόδεικτος. Ευχαριστώ θερμά την κα Αγγελική Τσόκα, για τις επιστημονικές γνώσεις και τις τεχνικές λεπτομέρειες που μου τόνισε, όπως επίσης και το μεταδιδάκτορα κ. Αναστάσιο Γεωργούλη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Ντότσικα, για τις γνώσεις και το χρόνο που μου αφιέρωσε, ώστε να ‘μνηθώ’ -έστω και λίγο- στο δύσκολο και βασικό κόσμο της Ανάλυσης στην έρευνα.

Επίσης, με το τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους Καθηγητές κα Νικολαΐς Πουλή και κ. Παναγιώτη Μαράκο για την

αγάπη που διατρέχουν για την Οργανική Σύνθεση και την οποία μου μετέδωσαν στα μαθήματα της Φαρμακευτικής Χημείας, αλλά και για την καθοδήγησή τους στην πορεία των σπουδών μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, ακόμη, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αγγελική Κουρουνάκη, που ως υπεύθυνη καθηγήτριά μου στις προπτυχιακές σπουδές ήταν πάντα πρόθυμη να με ακούσει και να με συμβουλευτεί από την πρώτη κιόλας μέρα μέχρι και σήμερα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τα μέλη του εργαστηρίου του Ιδρύματος 'Θώραξ' για τη συνεργασία και τη βοήθεια στην εκπόνηση της εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι υποψήφιοι διδάκτορες Αθανασία Παυλίδου και Παναγιώτης Αγιουτάντης, καθώς και οι μεταδιδάκτορες Ιωάννα Νικητοπούλου και Νίκολας Μανισσόπουλος ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειαζόμουν είτε στην επίλυση αποριών, είτε για εμπύχωση μετά από ένα αρνητικό αποτέλεσμα.

Δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ ξεχωριστά στη μεταδιδάκτορα Βυρωνία Βασιλακοπούλου, η βοήθεια της οποίας στην εργασία μου είναι ανεκτίμητη. Θαυμάζω ιδιαίτερα τη γρήγορη και πολύπλευρη σκέψη της, που με βοήθησε να προσπεράσω αρκετά εμπόδια στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου, μα πιο πολύ θαυμάζω και εκτιμώ την ουσιαστική αγάπη της για την έρευνα, όπως φαίνεται όχι μόνο από τις γνώσεις, αλλά κυρίως από τη μεταλαμπάδευση αυτών και την αφιέρωση χρόνου σε όσους επίδοξους ερευνητές την είχαν ανάγκη. Ευχαριστώ ειλικρινά για την εμπύχωση και τη δυνατότητα που μου έδωσε να μεταφέρω τις σκέψεις μου σε πειραματικά πρωτόκολλα και δεδομένα.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια, μα πάνω από όλα φίλη, Ηρώ Δαμοπούλου, για τη συμπαράσταση, την προστασία και την αγάπη της όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών, με την ευχή η κοινή μας πορεία να συνεχιστεί στην εργασία και τη ζωή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη και να εκφράσω το θαυμασμό μου στους Συνθετικούς Φαρμακοποιούς, Κωνσταντίνο Παρασκευά, Ευθύμη Γαβριήλ, Θάνο Παπασταθόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζουν η οικογένεια και οι φίλοι για την υπομονή και τη στήριξη που δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια. Η στήριξη αυτή, ήμουν τυχερή να είναι και επιστημονική, για αυτό και ευχαριστώ διπλά τον πατέρα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| <i>ΕΝΟΤΗΤΑ 1^η : ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i> | 5 |
| 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 6 |
| 1.2. ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΥΔΡΟΘΕΙΟ..... | 7 |
| 1.2.1. ΑΛΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΥΔΡΟΘΕΙΟΥ | 7 |
| 1.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ H ₂ S | 8 |
| 1.3.1. β-ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΑΘΕΙΟΝΙΝΗΣ (CYSTATHIONINE β-SYNTHASE, CBS)..... | 10 |
| 1.3.2. γ-ΛΥΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΑΘΕΙΟΝΙΝΗΣ (CYSTATHIONINE γ-LYASE, CSE) | 12 |
| 1.3.3. 3-ΜΕΡΚΑΠΤΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΘΕΙΟΤΡΑΣΦΕΡΑΣΗ (3-MERCAPTOPYRUVATE SULPHURTRANSFERASE, 3MST) | 13 |
| 1.4. ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ H ₂ S..... | 19 |
| 1.5. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ H ₂ S..... | 20 |
| 1.5.1. ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΟΛΗ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ..... | 22 |
| 1.5.2. ΑΝΤΙΜΙΤΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ | 23 |
| 1.5.3. ΧΡΟΝΟΤΡΟΠΟΣ ΚΑΙ ΙΝΟΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗ | 23 |
| 1.5.4. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ | 24 |
| 1.5.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ | 24 |
| 1.5.6. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ-ΕΝΕΡΓΕΙΑ | 25 |
| 1.6. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ | 25 |
| 1.7. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ..... | 27 |
| <i>ΕΝΟΤΗΤΑ 2^η : ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i> | 30 |
| 2.1. ΣΚΟΠΟΣ..... | 31 |
| 2.2. ΥΛΙΚΑ | 32 |
| 2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ | 32 |
| 2.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ | 34 |
| 2.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ..... | 35 |
| 2.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ-ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ... .. | 35 |
| 2.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ GST-h3MST ΕΝΖΥΜΟΥ | 38 |
| 2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST..... | 39 |
| 2.4.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΑΡΧΟΝΤΟΣ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ... .. | 39 |
| 2.4.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.4.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ | 41 |
| 2.4.4. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | 42 |
| 2.4.5. SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE) | 43 |
| 2.4.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ | 44 |
| 2.4.7. ΑΛΛΑΓΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ | 46 |
| 2.4.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ | 47 |
| 2.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST (METHYLENE BLUE ASSAY) | 47 |
| 2.5.1. METHYLENE BLUE ASSAY | 47 |
| 2.5.2. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ | 50 |
| 2.5.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ | 51 |
| 2.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ | 52 |
| 2.7. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ | 56 |
| 2.7.1. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST | 58 |
| 2.7.2. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ..... | 58 |
| 2.7.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DTT ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ | 58 |
| <i>ΕΝΟΤΗΤΑ 3η : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> | 60 |
| 3.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST..... | 61 |
| 3.1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ 3MST ΕΝΖΥΜΟΥ | 61 |
| 3.1.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ | 62 |
| 3.1.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ | 65 |
| 3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST (METHYLENE BLUE ASSAY) | 65 |
| 3.2.1. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ | 65 |
| 3.2.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ | 67 |
| 3.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ | 72 |
| 3.4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ | 77 |
| 3.4.1. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST | 77 |
| 3.4.2. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ..... | 84 |
| 3.4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DTT ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ | 85 |
| <i>ΕΝΟΤΗΤΑ 4η : ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i> | 88 |
| 4.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 89 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 92 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το H₂S κατατάσσεται στην ομάδα των αέριων διαβιβαστών μαζί με το NO και το CO. Παράγεται ενδογενώς κυρίως με ενζυμική διαδικασία από τα ένζυμα β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS), γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE) και 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (3MST). Το H₂S εμπλέκεται σε μια πληθώρα ενδογενών σηματοδοτικών μονοπατιών, ρυθμίζοντας έτσι διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Η συμβολή του στην ομοίωση του οργανισμού γίνεται ιδιαίτερα εμφανής σε περιπτώσεις είτε μειωμένης, είτε αυξημένης ενδογενούς σύνθεσής του, οι οποίες οδηγούν ή συμμετέχουν στην ανάπτυξη νόσων. Με σκοπό την ενδελεχή διερεύνηση του ρόλου του αερίου διαβιβαστή στις διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, καθίσταται απαραίτητη η διαλεύκανση των βιολογικών δράσεων των ενζύμων βιοσύνθεσής του στον οργανισμό. Δεδομένων των ελλিপών βιβλιογραφικών στοιχείων σχετικά με το ένζυμο 3MST -συγκριτικά με τα άλλα δύο ένζυμα παραγωγής υδροθείου- στην παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρωθήκαμε στο εν λόγω ένζυμο.

Σε πρώτο βήμα, προβήκαμε στη βελτιστοποίηση της παραγωγής του ενζύμου 3MST από βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli*, τα οποία έφεραν ως φορέα κλωνοποίησης πλασμίδιο με ενσωματωμένη την αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης πρωτεΐνης 3MST, ως χιμαιρική πρωτεΐνη με την S-τρανσφεράση της γλουταθειονίνης (GST). Σε δεύτερο βήμα, έπειτα από λεπτομερή έρευνα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και αρκετές δοκιμές, καταφέραμε να βελτιστοποιήσουμε τη μέθοδο 'κυανούν του μεθυλενίου' (Methylene Blue Assay) για τον έλεγχο της δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου.

Μέχρι προσφάτως, καμία ένωση δεν είχε χαρακτηριστεί ως αναστολέας του ενζύμου 3MST. Σημειώνεται πως η χρήση μορίων με ανασταλτική ή και ενισχυτική δράση σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα, μπορεί να αποκαλύψει ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο ενός ενζύμου στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία. Με γνώμονα, λοιπόν, την ανακάλυψη μορίων με ανασταλτική δράση επί του ενζύμου ή έστω 'μορίων-οδηγών' που θα χρησιμοποιηθούν ως 'καλούπια' για τη σχεδίαση ισχυρότερων αναστολέων, προβήκαμε, τέλος, στη μελέτη της επίδρασης των μορίων των τετρακυκλινών στη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της εργασίας μπορούν να χαρακτηριστούν ως ενθαρρυντικά, με συγκεκριμένες τετρακυκλίνες να αποδεικνύονται αναστολείς του 3MST. Περαιτέρω πειράματα μάς έδωσαν ικανοποιητικά στοιχεία για να διατυπώσουμε υποθέσεις σχετικά με το μηχανισμό ανασταλτικής δράσης αυτών των ενώσεων.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is the third gasotransmitter after NO and CO and it is produced endogenously via non-enzymatic or enzymatic pathways, with the latter being the most common. Cystathionine beta synthase (CBS), cystathionine gamma lyase (CSE) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase are the enzymes responsible for its biosynthesis. H₂S is involved in a variety of endogenous signaling pathways, thereby regulating various physiological functions. Its contribution to the homeostasis of the human organism becomes particularly evident in cases of either reduced or increased endogenous synthesis, which results in or contributes to different diseases. In order to thoroughly investigate the role of the gaseous transmitter in various pathophysiological conditions, it becomes necessary to elucidate the role of the enzymes of its biosynthesis in mammalian organisms. Given the fact that few bibliographic data is published upon the 3MST enzyme -comparably with the other two enzymes- our thesis focuses on 3MST.

Firstly, we optimized the production of the 3MST enzyme from *Escherichia coli* bacterial cells. The plasmids that were introduced into the bacterial cells, contained the sequence of human 3MST in frame with glutathione S-transferase (GST). Secondly, following a detailed study of the existing literature and several experiments, we succeeded in optimizing the "methylene blue" method in order to examine the activity of this enzyme.

It is noteworthy that the 3MST enzyme lacks extensive literature and until recently, no substance was described as its inhibitor. It is also well known that the use of molecules with inhibitory or amplifying activity in in vitro and in vivo experiments may reveal interesting results regarding the role of an enzyme in the physiology and pathophysiology of the studied organism. Therefore, the discovery of molecules with inhibitory activity on this enzyme or even the discovery of hit compounds which could be improved in order for stronger inhibitors to be made, would be of great significance. Given this, we tested the effect of different molecules characterized as tetracyclines on the enzyme activity. Our first results can be described as encouraging, as specific tetracyclines show inhibition of the 3MST. Further experiments allowed us to speculate the mechanism of these inhibitor molecules.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1^η :
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το H₂S είναι ένα άχρωμο και εύφλεκτο αέριο, η χαρακτηριστική μυρωδιά του οποίου θυμίζει αυτή των κλούβιων αυγών και γίνεται αντιληπτή από τον άνθρωπο σε συγκεντρώσεις μόλις 0,5 ppb.^{1,2}

Οι πηγές αυτού του μορίου είναι ποικίλες. Ανάμεσά τους συγκαταλέγονται η βακτηριακή διάσπαση της οργανικής ύλης, που συμβαίνει σε βάλτους και υπονόμους κάτω από αναερόβιες συνθήκες, καθώς και τα ηφαιστειακά αέρια, το φυσικό αέριο και συγκεκριμένες βιομηχανικές δραστηριότητες.³ Όσον αφορά στα έμβια όντα, η παραγωγή του H₂S επεκτείνεται πέραν των βακτηρίων και σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.^{1,4-7}

Για χρόνια το αέριο αυτό ήταν συνδεδεμένο αποκλειστικά με την καταστροφή του περιβάλλοντος και τον τραγικό θάνατο εκατοντάδων ανθρώπων. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 4 ppm σε κλειστούς χώρους, όπως οι σηπτικές δεξαμενές και οι βόθροι, η ξαφνική απελευθέρωσή του από πηγές πετρελαίου και διυλιστήρια συσχετίστηκαν με την πρόκληση στιγμιαίας απώλειας συνείδησης ή και αναπνευστικών προβλημάτων.¹ Η τοξικότητα του υδροθείου αποδόθηκε στην αντιστρεπτή αναστολή που μπορεί να προκαλέσει στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, κατά τη διαδικασία της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια.⁸⁻¹² Ακόμη, το αέριο αυτό στοχεύει τα οσφρητικά νεύρα, τα μάτια και τον εγκέφαλο, γεγονός που το κατέστησε περισσότερο τοξικό από το υδροκυάνιο.⁹

Μόλις το 1984 η αντίληψη αυτή άρχισε να αναστρέφεται, ενώ το 1996 δημοσιεύθηκε η πρώτη μελέτη που παρουσίαζε το H₂S ως σηματοδοτικό μόριο με δράση στο νευρικό σύστημα.¹⁰⁻¹² Έκτοτε, η έρευνα σχετικά με το αέριο αυτό έχει περάσει από τα τοξικολογικά εργαστήρια στα εργαστήρια των φαρμακολόγων με μία αλματώδη εξέλιξη, κατατάσσοντας το υδρόθειο ως τον τρίτο αέριο διαβιβαστή. Κλειδί για την περαιτέρω αποκωδικοποίηση του ρόλου του H₂S τόσο στη φυσιολογία, όσο και στην παθοφυσιολογία φαίνεται να αποτελεί η ανάπτυξη μορίων με ανασταλτική ή ενισχυτική δράση επί των ενζύμων παραγωγής του, για αυτό και η σύγχρονη έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη τέτοιων καινοτόμων ενώσεων για μελέτη σε επίπεδο *in vitro* και *in vivo*.^{13,14}

1.2. ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΥΔΡΟΘΕΙΟ

Το H_2S αποτελεί τον τρίτο αέριο διαβιβαστή μετά το NO και το CO . Τα κοινά χαρακτηριστικά που κατατάσσουν και τα τρία αυτά μόρια στην ίδια οικογένεια διατυπώθηκαν το 2002 από τους Wang et al. και συνοψίζονται στα εξής:^{10,14,15}

- i. Είναι μικρού μεγέθους αέρια μόρια.
- ii. Διαπερνούν εύκολα τις μεμβράνες χάρη στην υδροφοβικότητά τους, επομένως η δράση τους δεν εξαρτάται από τη σύνδεσή τους σε μεμβρανικούς υποδοχείς. Η δράση τους μπορεί να είναι ενδοκρινική, παρακρινική ή αυτοκρινική.
- iii. Παράγονται ενδογενώς κυρίως με ενζυμική διαδικασία.
- iv. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν καθορισμένες λειτουργίες, ενώ μεταβολές στα επίπεδα αυτών επιφέρουν αλλαγές στη φυσιολογία του οργανισμού.
- v. Η εξωγενής χορήγηση αυτών των μορίων μπορεί να μιμηθεί τις ενδογενείς λειτουργίες τους.
- vi. Τα μόρια αυτά έχουν ειδικούς κυτταρικούς και μοριακούς στόχους.

Τα επίπεδα του υδροθείου στον οργανισμό αποτελούν θέμα διαμάχης, με τις τελευταίες μελέτες να συγκλίνουν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10 nM έως 3 μM ^{10,16}, με λίγες να ισχυρίζονται πως οι τιμές μπορούν να φτάσουν και τα 30 μM .¹⁷ Επισημαίνεται πως οι τιμές αυτές αφορούν σε συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης και συνεπώς, δεν αντικατοπτρίζουν τυχόν μεταβολές κατά τη διάρκεια της δραστηριότητας του κυττάρου, ούτε εξειδίκευση ανάλογα με τον κυτταρικό ιστό.^{10,18}

1.2.1. ΑΛΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΥΔΡΟΘΕΙΟΥ

Λαμβάνοντας υπόψιν πως το H_2S είναι ένα ασθενές οξύ με $pK_a=6,76$ στους $37^\circ C$, συμπεραίνουμε πως σε φυσιολογικές συνθήκες, περίπου το 20% θα βρίσκεται υπό τη μη ιονισμένη μορφή του, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό ως σουλφυδρυλικό ανιόν, SH^- .¹⁹ Νεότερες μελέτες καταδεικνύουν τον εξίσου σημαντικό ρόλο του ανιόντος στις βιολογικές δράσεις που μέχρι τώρα αποδίδονταν στον αέριο διαβιβαστή, με έμφαση στην πυρηνόφιλη φύση του ανιόντος. Σημειώνεται πως το πυρηνόφιλο SH^- συνδέεται με βιολογικά μόρια που έχουν στο κέντρο τους μέταλλα, όπως η αιμογλοβίνη, ή με άλλες ηλεκτρονιόφιλες ουσίες. Η δεύτερη pK_a του H_2S είναι αρκετά υψηλή, επομένως το ανιόν S^{2-} βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις φυσιολογικά.⁹

Ακόμη, τα τελευταία χρόνια, τα πολυσουλφίδια -μόρια με γενικό τύπο $H_2S_{(3-7)}$ - καθώς και το δισουλφίδιο του υδρογόνου $-H_2S_2-$, έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί φυσιολογικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης του υδροθείου. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί πως τα πολυσουλφίδια ενεργοποιούν κανάλια, μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και ένζυμα μέσω της αντίδρασης σουλφυδρυλίωσης των μορίων-στόχων, ενώ διαθέτουν ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες από το υδροθείο. Τα μόρια αυτά έχουν ήδη εντοπιστεί στον εγκέφαλο των θηλαστικών και θέτουν ξανά στο επίκεντρο ερωτήσεις σχετικά με το αν μέρος των γνωστών βιολογικών δράσεων του υδροθείου πρέπει πλέον να αποδίδονται στα πολυσουλφίδια.^{10,20-23}

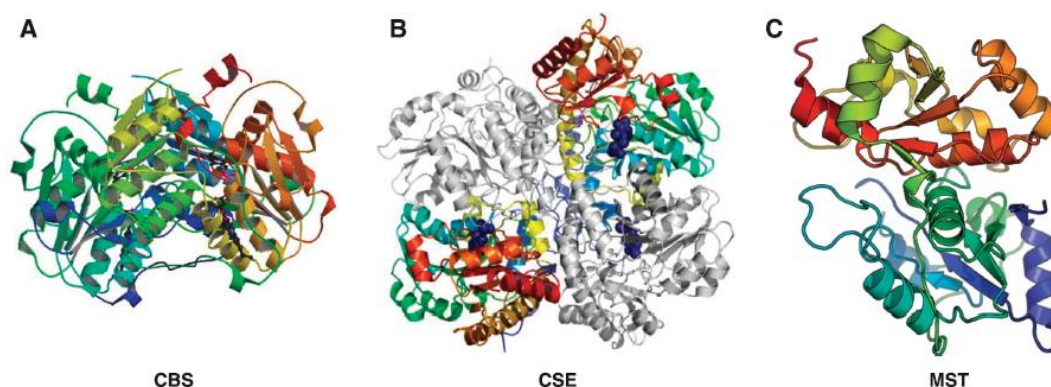
1.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ H_2S

Υπάρχουν δύο τρόποι παραγωγής του H_2S ενδογενώς στα θηλαστικά: μη ενζυμικός και ενζυμικός, με το δεύτερο να γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό.

Στο μη ενζυμικό τρόπο παραγωγής του υδροθείου περιλαμβάνεται η αναγωγή του στοιχειακού θείου ή ανόργανων πολυσουλφιδίων στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, κάτω από καταστάσεις οξειδωτικού stress και υπεργλυκαιμίας, όπως επίσης στους νευρώνες και τα αστροκύτταρα. Τα επίπεδα του υδροθείου που απελευθερώνονται από τις μορφές αυτές, όπου το θείο βρίσκεται συνδεδεμένο με άλλες ομάδες, εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των αναγωγικών παραγόντων που ανιχνεύονται στα διάφορα είδη ιστών.^{1,10,13,16} Υδροθείο απελευθερώνεται ακόμη από τη διαιτητική πρόσληψη πολυσουλφιδίων και περσουλφιδίων και τη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα.²⁴ Ένα ακόμη μονοπάτι που οδηγεί στην παραγωγή του αερίου διαβιβαστή ξεκινά από τη μη ενζυμική οξείδωση των σουλφιδίων (S^{2-}) σε θειοθειικά ($S_2O_3^{2-}$). Αυτά μετατρέπονται σε θειώδη (SO_3^{2-}) είτε μέσω της αναγωγάσης των θειοθειικών -στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους ιστούς του εγκεφάλου- ή μέσω της σουλφοτρανσφεράσης των θειοθειικών - στο ήπαρ. Τέλος, υδροθείο απελευθερώνεται και από ενδοκυττάρια αποθήκες άλλων μορίων που περιέχουν θείο, όπως οι λεγόμενες 'ferredoxins' (Fe_2S_2 , Fe_3S_4 , Fe_4S_4).^{1,13,24}

Στην περίπτωση της ενζυμικής παραγωγής του H_2S , έχουν ταυτοποιηθεί τρία ένζυμα βιοσύνθεσης -η β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS), η γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE) και η 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (3MST)- τα οποία εκφράζονται σε διαφορετικό ποσοστό στους διάφορους ιστούς. Τα ένζυμα CBS και CSE δίνουν H_2S μέσω του μονοπατιού «reverse transsulfuration», όπου η κυστεΐνη συντίθεται από μεθειονίνη. Πιο αναλυτικά, η μεθειονίνη μετατρέπεται από την αδενοσυλοτρανσφεράση της μεθειονίνης (MAT) σε S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM). Με την απομάκρυνση της μεθυλικής ομάδας της SAM παράγεται η S-

Στην κάτωθι εικόνα παρουσιάζονται οι κρυσταλλικές δομές των ενζύμων παραγωγής του αέριου διαβιβαστή.



Εικόνα 2: Κρυσταλλικές δομές των ενζύμων παραγωγής H_2S ¹

1.3.1. β -ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΑΘΕΙΟΝΙΝΗΣ (CYSTATHIONINE β -SYNTHASE, CBS)

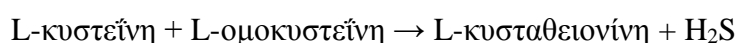
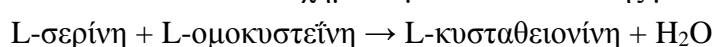
Εντοπισμός

Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε πολλά όργανα και ιστούς όπως τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τους νεφρούς, τον ειλέο, τη μήτρα και τον πλακούντα.^{3,26} Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν έκφραση του ενζύμου αυτού στο πάγκρεας, τη μεσεντέρια αρτηρία και το καρωτιδικό σώμα.²⁴⁻²⁷ Η έκφρασή του είναι σπάνια στο καρδιαγγειακό σύστημα, το αναπνευστικό, τους όρχεις, τα επινεφρίδια και το σπλήνα.¹ Ενδοκυττάρια συναντάται κυρίως στο κυτοσόλιο, αλλά έχει βρεθεί και στα μιτοχόνδρια.²⁸ Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του CBS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 (43.35– 43.37 Mb).¹

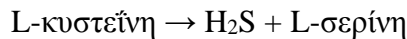
Αντιδράσεις

Το CBS χρησιμοποιεί ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη (Vit B6) συμμετέχοντας σε αντιδράσεις του μονοπατιού 'reverse transulfuration'. Στα υποστρώματά του συμπεριλαμβάνονται η L-ομοκυστεΐνη, η L-κυστεΐνη και η L-σερίνη. Οι κυριότερες αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει είναι οι ακόλουθες:^{10,29,30}

Το CBS καταλυεί το σχηματισμό κυσταθειονίνης μέσω δύο μονοπατιών:

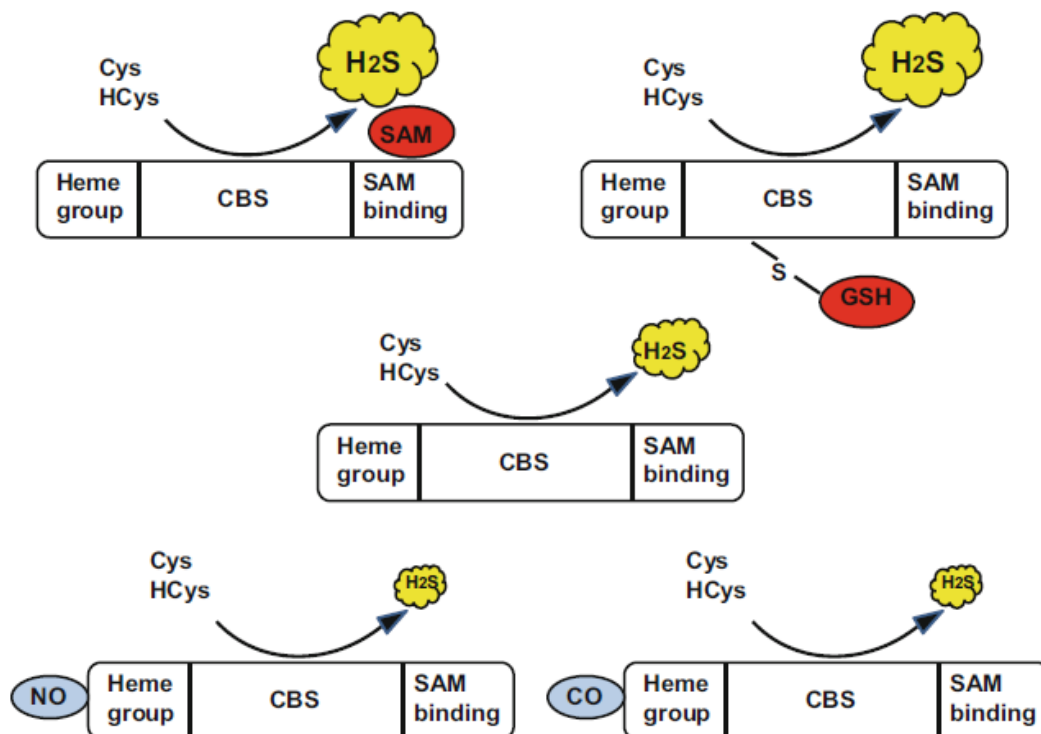


Βιοσυνθέτει υδρόθειο μέσω ενός ακόμη μονοπατιού που λαμβάνει χώρα σε μικρότερο ποσοστό:



Δομή

Το ένζυμο αυτό διαθέτει τρεις περιοχές ρυθμιστικές για τη δραστηριότητά του. Η πρώτη αφορά στη σύνδεση με την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) στο καρβοξυτελικό άκρο, η δεύτερη στην ομάδα αίμης που φέρει στο αμινοτελικό άκρο και η τρίτη την κυστεΐνη 346 (Cys346) που είναι υπεύθυνη για την S-γλουταθειονυλίωση. Η περιοχή στην οποία γίνεται η πρόσδεση του SAM καλύπτει εν μέρει την καταλυτική περιοχή του ενζύμου απουσία SAM, ενώ αντιθέτως με την πρόσδεση του εν λόγω μορίου επιτρέπεται η 'αποκάλυψη' του ενεργού κέντρου και η αυξημένη παραγωγή υδροθείου.¹¹ Η ομάδα αίμης φέρει σίδηρο στη δισθενή του μορφή (Fe(II)), ο οποίος έπειτα από τη σύνδεση με έναν από τους άλλους δύο αέριους διαβίβαστες αναστέλλει τη δράση του ενζύμου. Η οξειδωμένη μορφή του σιδήρου επιτρέπει την παραγωγή υδροθείου.¹⁰ Η κυστεΐνη της θέσης 346 κάτω από συνθήκες οξειδωτικού stress οξειδώνεται σε σουλφονικό οξύ, το οποίο αντιδρά με τη γλουταθειονίνη. Η δραστηριότητα του ενζύμου ενισχύεται μέσω της αντίδρασης γλουταθειονυλίωσης αυξάνοντας το παραγόμενο υδρόθειο και την κυστεΐνη.¹⁰



Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή υδροθείου από το ένζυμο CBS¹⁰

Αξίζει να σημειωθεί πως η σταθερά Km για το ένζυμο CBS είναι 3,6 mM, ενώ η ενδοκυτταρική συγκέντρωση κυστεΐνης μόλις 100 uM -εξαιρουμένων των νεφρών όπου η συγκέντρωση είναι της τάξεως του 1mM. Η σύγκριση αυτή των τιμών εξάγει το συμπέρασμα πως η παραγωγή υδροθείου από το ένζυμο αυτό πρέπει να γίνεται με αργό ρυθμό.^{29,30} Η πρόσδεση όμως του SAM, η γλουταθειονυλίωση, η ομοκυστεΐνη ως ένα ακόμη υπόστρωμα, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τα επίπεδα του υδροθείου και να προκαλέσουν φυσιολογικές δράσεις, παρά τη μικρή ενδοκυττάρια συγκέντρωση κυστεΐνης.^{11,30}

1.3.2. γ-ΛΥΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΑΘΕΙΟΝΙΝΗΣ (CYSTATHIONINE γ-LYASE, CSE)

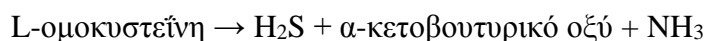
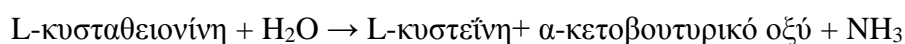
Εντοπισμός

Το συγκεκριμένο ένζυμο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1, p31.1. και έχει μοριακό βάρος 44,508 kDa. Εκφράζεται σε μεγαλύτερο εύρος ιστών σε σύγκριση με το CBS - ιδιαιτέρως στο καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα.³¹ Επίσης, είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής H₂S στο ήπαρ, τους νεφρούς, τη μήτρα, τον πλακούντα, τους λείους μυς, καθώς και τα νησίδια του παγκρέατος.^{3,24} Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στο κυτοσόλιο, ωστόσο σε περιπτώσεις όπως η αύξηση του ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου, παρατηρείται μετακίνησή του στα μιτοχόνδρια.²⁸

Αντιδράσεις

Το CSE χρησιμοποιεί, όπως και το CBS, τη φωσφορική πυριδοξάλη ως συνένζυμο. Υποστρώματα του ενζύμου είναι η L-κυστεΐνη, η L-κυσταθειονίνη και η L-ομοκυστεΐνη.¹⁰ Οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει αφορούν στο δεύτερο στάδιο του μονοπατιού «reverse transsulfuration» προς σχηματισμό L-κυστεΐνης και στη συνέχεια στη χρήση αυτής ως υπόστρωμα για το σχηματισμό H₂S, NH₃ και πυροσταφυλικού οξέος.¹

Οι αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται παρουσιάζονται συνοπτικά:¹⁰



Αξίζει να σημειωθεί πως η σταθερά Km για το ένζυμο CSE είναι 1,7mM, ενώ η ενδοκυτταρική συγκέντρωση κυστεΐνης μόλις 100 uM -εξαιρουμένων των νεφρών όπου η συγκέντρωση είναι της τάξεως του 1mM. Η σύγκριση αυτή των τιμών εξάγει

το συμπέρασμα πως η παραγωγή υδροθείου από το εν λόγω ένζυμο πρέπει να γίνεται με αργό ρυθμό.^{29,30}

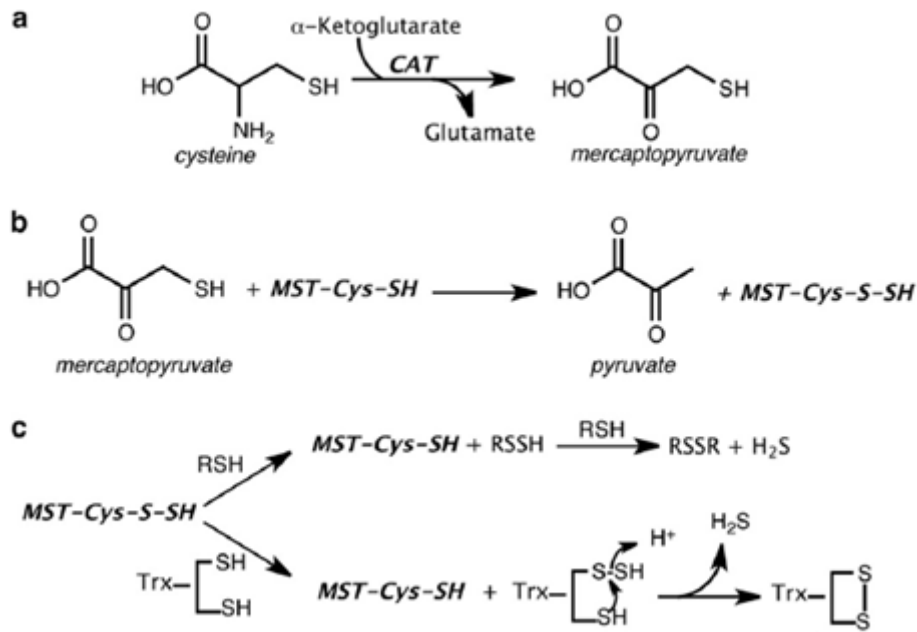
1.3.3. 3-ΜΕΡΚΑΠΤΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΘΕΙΟΤΡΑΣΦΕΡΑΣΗ (3-MERCAPTOPYRUVATE SULPHURTRANSFERASE, 3MST)

Εντοπισμός

Το τρίτο ένζυμο παραγωγής υδροθείου, το 3MST, έχει μοριακό βάρος 33,455 kDa και απαντάται σε πολλούς ιστούς.¹⁷ Εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον εγκέφαλο, τους νεφρούς, το ήπαρ, την καρδιά και είναι υπεύθυνο για τη μεγαλύτερη παραγωγή H₂S στους νευρώνες.^{10,17} Μαζί με το ένζυμο αμινοτρασφεράση της κυστεΐνης (CAT) αποτελεί ένα τρίτο μονοπάτι παραγωγής H₂S. Τόσο το 3MST, όσο και το CAT εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια.^{1,32,33} Αξίζει να σημειωθεί, όμως, πως δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης κυστεΐνης στα μιτοχόνδρια, περί το 1mM, το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου υδροθείου από το εν λόγω ένζυμο εντοπίζεται στα κυτταρικά αυτά οργανίδια.^{10,33}

Αντιδράσεις

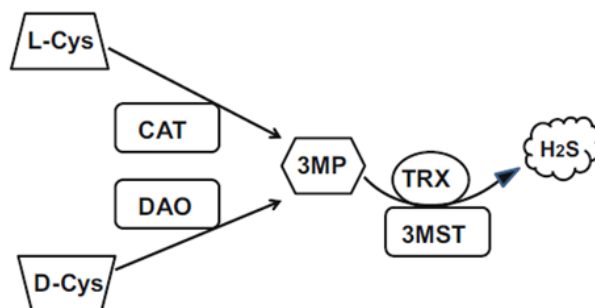
Το 3MST δρα με συμπράγοντα τον ψευδάργυρο. Παρουσία του ενζύμου αμινοτρασφεράση της κυστεΐνης (cysteine aminotransferase, CAT) ή αλλιώς αμινοτρασφεράση του ασπαρτικού, το οποίο χρησιμοποιεί ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη, η κυστεΐνη μετατρέπεται σε 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ (3-MP) με την ενσωμάτωση ενός α-κετογλουταρικού οξέος.^{10,34,35} Στη συνέχεια, το θείο από το 3-MP μεταφέρεται στην κυστεΐνη 248 του ενεργού κέντρου του ενζύμου σχηματίζοντας ένα περσουλφίδιο.³² Υπό τη δράση αναγωγικών παραγόντων, όπως ηθειορεδοξίνη ή το διυδρολιποϊκό οξύ, απελευθερώνεται υδρόθειο και πυροσταφυλικό οξύ.^{17,36} Το θείο από τη δομή περσουλφιδίου του ενζύμου μπορεί να μεταφερθεί και σε έναν άλλο δέκτη, όπως το κυάνιο, σχηματίζοντας το λιγότερο τοξικό παράγωγο, θειοκυάνιο.¹⁷ Η αντίδραση αυτή μετατροπής του κυανίου σε θειοκυανικό καθιστά το 3MST 'αποτοξινωτικό ένζυμο'.³²



Εικόνα 4: Διαδοχικές αντιδράσεις προς παραγωγή υδροθείου από το ένζυμο 3MST¹⁷

Το ένζυμο αυτό καταλύει επίσης τον ίδιο τύπο αντίδρασης μεταφέροντας θείο από το θειοθειικό ως υπόστρωμα σε άλλη θείουχα ομάδα σχηματίζοντας έτσι πολυσουλφίδια. Και πάλι, ο σχηματισμός του πολυσουλφιδίου με τη συνακόλουθη δράση αναγωγικού, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υδροθείου.³²

Πρόσφατα ένα ακόμη μονοπάτι έχει περιγραφεί, κατά το οποίο το αμινοξύ D-cysteine μεταβολίζεται σε 3MP από την D-αμινοοξειδάση, ένζυμο που εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα. Το παραγόμενο 3MP μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, όπου ακολουθούνται οι συνήθεις αντιδράσεις. Το μονοπάτι αυτό έχει χαρακτηριστεί κυρίως στον εγκέφαλο και τους νεφρούς από την ομάδα του ερευνητή Shibuya.¹⁰



Εικόνα 5: Παραγωγή υδροθείου από το ένζυμο 3MST με αρχικό μόριο το αμινοξύ L- και D-cysteine¹⁰

Δομή

Το ένζυμο παρουσιάζει διαμόρφωση όμοια με αυτή που παρατηρείται στην οικογένεια της ροδανάσης. Το N-τελικό άκρο (1-138 κατάλοιπα) και το C-τελικό άκρο (165-285) ενώνονται από έναν επιμήκη συνδέτη (139-164 κατάλοιπα), ο οποίος αναδιπλώνεται και αλληλεπιδρά και με τις δύο περιοχές. Αμινοξικά τμήματα των περιοχών αυτών συμμετέχουν στη δομή του ενεργού κέντρου, το οποίο εντοπίζεται εντός μία σχισμής που δημιουργείται ανάμεσα στο N- και το C-τελικό άκρο. Η δομή του ενζύμου ενόσω το υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο, δε διαφέρει σημαντικά από τη δομή του ελεύθερου ενζύμου, υποδηλώνοντας πως η πρόσδεση του υποστρώματος δεν επιφέρει μεγάλες δομικές αλλαγές. Σημειώνεται πως η πρώτη κρυσταλλική δομή του ενζύμου και η περιγραφή του αναλυτικού μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης περιγράφηκε προσφάτως από τους Yadav et al.¹⁷



Εικόνα 6: Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου 3MST με απεικόνιση με τη μορφή κορδέλας: με μπλε κορδέλα παρουσιάζεται η περιοχή του N-τελικού άκρου, ενώ με λιλά η περιοχή του C-τελικού άκρου. Σε φούξια απόχρωση παρουσιάζεται ο συνδέτης των δύο περιοχών¹⁷

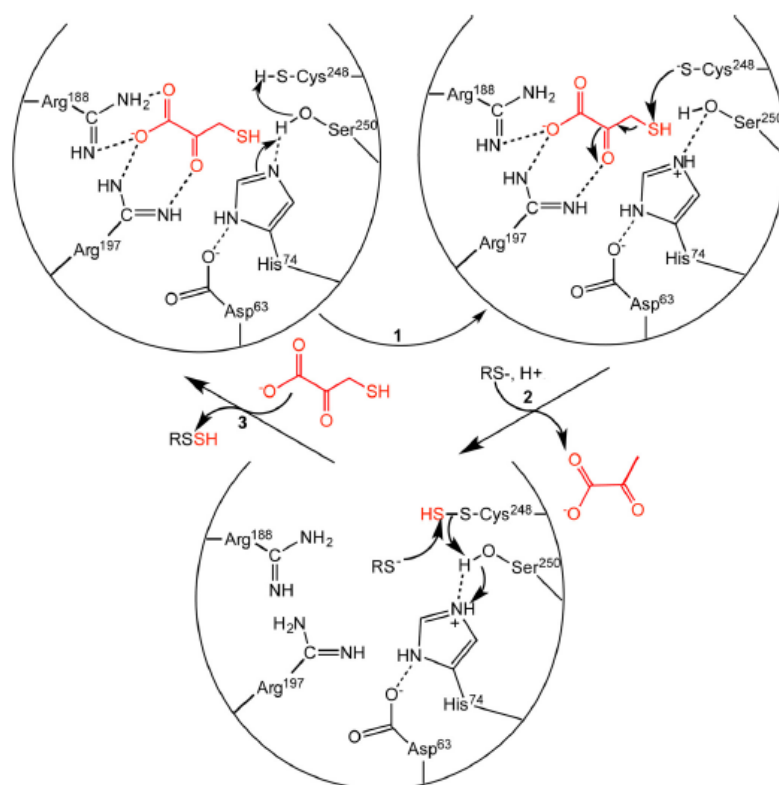
Μηχανισμός καταλυτικής αντίδρασης

Το ένζυμο 3MST ανήκει στην υπεροικογένεια των θειοτρανσφερασών με δομική ομοιότητα περί το 60% σε σχέση με το βασικό εκπρόσωπο της κατηγορίας, τη ροδανάση.^{114,117,118} Απαραίτητο δομικό στοιχείο που φαίνεται να διατηρείται, αποτελεί η κυστεΐνη της θέσης 248. Το πυρηνόφιλο αυτό κατάλοιπο λαμβάνει το θείο από το υπόστρωμα 3-MP και σχηματίζεται έτσι η δομή περσουλφιδίου (MST-Cys-S-SH). Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα έπειτα από την ενεργοποίηση του καταλοίπου κυστεΐνης μέσω της καταλυτικής τριάδας Ser250, His74, and Asp63. Πιθανολογείται πως η ιστιδίνη και το ασπαρτικό χαμηλώνουν το pKa της υδροξυλικής ομάδας της σερίνης, με αποτέλεσμα η ιστιδίνη να αποσπά ένα πρωτόνιο από τη σερίνη της θέσης 250. Η σερίνη με τη σειρά της ενεργοποιεί την κυστεΐνη της θέσης 248 ώστε να αντιδράσει με τη σουλφυδρυλική ομάδα του υποστρώματος, σχηματίζοντας έτσι τη δομή περσουλφιδίου του ενζύμου και το πυροσταφυλικό ανιόν. Το θετικό φορτίο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς και το υδροξύλιο της σερίνης 250 και η πλευρική

αλυσίδα της αργινίνης φαίνεται να σταθεροποιούν το προκύπτον ανιόν. Το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει τη μεταφορά του θείου από το περσουλφίδιο σε ένα δέκτη, έτσι ώστε να απελευθερωθεί ο αέριος διαβιβαστής.¹⁷

Τα σχηματιζόμενα περσουλφίδια στις πρωτεϊνικές δομές έγιναν ιδιαίτερα γνωστά τα τελευταία χρόνια ως ενδιάμεσα, τα οποία διευκολύνουν τη μεταφορά θείου σε διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια.¹⁰ Αξίζει να σημειωθεί πως εκτεταμένες μελέτες αποδεικνύουν τη σταθερότητα του συγκεκριμένου περσουλφιδίου, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση πως το ένζυμο αυτό ίσως να λειτουργεί και ως αποθήκη υδροθείου για τον οργανισμό, απελευθερώνοντας τον αέριο διαβιβαστή όταν οι συνθήκες το απαιτούν. Η υπόθεση αυτή δεν είναι διόλου επισφαλής, εάν συνυπολογίσουμε το ότι το ένζυμο αυτό δρα ως ανιχνευτής οξειδωτικών αλλαγών, όπως αναλύεται στη συνέχεια.³²

Σημειώνεται πως τα δύο κατάλοιπα αργινίνης στις θέσεις 188 και 197 αλληλεπιδρούν με τις ομάδες καρβονυλίου και καρβοξυλίου του υποστρώματος 3-MP, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα αυτού του υποστρώματος για το ένζυμο, έναντι του θειοθειικού.^{17,118}



Εικόνα 7: Πιθανός μηχανισμός της καταλυτικής αντίδρασης του ενζύμου 3MST ¹⁷

Ο μηχανισμός της καταλυτικής αντίδρασης όπως περιγράφηκε ομοιάζει με το μηχανισμό που ακολουθούν πολλά ένζυμα, όπως τρανσφεράσες, οξυρεδουκτάσες και πρωτεάσες σερίνης, ο οποίος περιγράφεται στη βιβλιογραφία ως 'ring pong mechanism'.³⁷ Η ορολογία αυτή προσπαθεί να περιγράψει το μηχανισμό, αφού η παραγωγή του προϊόντος γίνεται με το ένζυμο να αλληλεπιδρά διαδοχικά σαν μπαλάκι του ring pong με δύο ομάδες, οι οποίες παίζουν το ρόλο των υποστρώματων. Πιο συγκεκριμένα, το υπόστρωμα, 3-μερκαπτοपुरοσταφυλικό, μεταφέρει την ομάδα θείου του και αλλάζει τη δομή του ενζύμου σχηματίζοντας τη δομή περσουλφιδίου στην κυστεΐνη 248. Σε επόμενο στάδιο, το πρώτο υπόστρωμα αποχωρεί και επιτρέπεται η σύνδεση του δεύτερου με το ένζυμο. Το δεύτερο υπόστρωμα, στην περίπτωση μας το αναγωγικό, αντιδρά με το ένζυμο και το επαναφέρει στην πρότερή του κατάσταση, ενώ παράλληλα σχηματίζεται το προϊόν της αντίδρασης. Αρκετά πειράματα αποδεικνύουν την ισχύ του εν λόγω μηχανισμού για το ένζυμο 3MST και αναφέρουν τόσο το 3-μερκαπτοपुरοσταφυλικό, όσο και το αναγωγικό ως υποστρώματα του ενζύμου.³⁸⁻⁴⁰

Αναγωγικό

Σημειώνεται πως σε αντίθεση με τα άλλα δύο ένζυμα παραγωγής υδροθείου, το αναγωγικό μέσο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση του αέριου διαβιβαστή από το 3MST, όπως φάνηκε άλλωστε και από το μηχανισμό της καταλυτικής αντίδρασης.¹⁰⁻¹⁷ Εκτεταμένες έρευνες από την ομάδα της ερευνήτριας Banerjee σχετικά με το αναγωγικό μέσο που προσφέρεται για την αντίδραση του ενζύμου 3MST περιελάμβαναν τόσο αναγωγικούς παράγοντες που ανιχνεύονται φυσιολογικά και μη, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη και η διθειοθρεϊτόλη. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης έδειχνε πως η θειορεδοξίνη (Trx), ως διθειόλη, φαίνεται να είναι ο καταλληλότερος αναγωγικός παράγοντας που υπάρχει φυσιολογικά και μπορεί να συμμετέχει στην αντίδραση του ενζύμου. Μία ακόμη διθειόλη, το διυδρολιποϊκό (DHLA), επίσης φαίνεται να συμμετέχει στην αντίδραση, όχι όμως με την ίδια απόδοση όπως η Trx. Εν αντιθέσει, οι μονοθειόλες, όπως η L-cysteine και η γλουταθειόνη δε φαίνονται να βοηθούν στην αντίδραση παραγωγής υδροθείου. Η διθειοθρεϊτόλη (DTT) και η 2-μερκαπτοαιθανόλη ανήκουν επίσης στην κατηγορία των διθειολών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* πειράματα κατά τη μελέτη του ενζύμου 3MST, δεδομένου πως δεν υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό. Όμως, και πάλι η θειορεδοξίνη φαίνεται ειδικότερη στην αντίδραση του εν λόγω ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί πως το ποιο αναγωγικό εν τέλει θα συμμετάσχει στην αντίδραση παραγωγής υδροθείου εξαρτάται από τον τύπο του ιστού και άρα, τα διαθέσιμα αναγωγικά μέσα σε σχέση με τις συγκεντρώσεις αυτών και τις σταθερές Michaelis-Menten.^{17,36,41} Η ενδογενής αναγωγική ουσία θειορεδοξίνη απαντάται ενδοκυτταρικά σε συγκεντρώσεις περί τα 20 μM , ενώ το διυδρολιποϊκό στη διπλάσια συγκέντρωση

στα μιτοχόνδρια.^{10,41} Η έρευνα σχετικά με το αναγωγικό μέσο επιβεβαιώνεται και από πλήθος άλλων μελετών.^{32,38,40,42-44,90,115-116,119}

Οξειδοαναγωγική ρύθμιση

Η δράση του 3MST ενζύμου ρυθμίζεται από την υπάρχουσα οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Κάτω από οξειδωτικές συνθήκες, παρατηρείται αναστρέψιμη αναστολή του ενζύμου, που οδηγεί σε αύξηση των αποθεμάτων κυστεΐνης. Ως γνωστόν, η κυστεΐνη αποτελεί πρόδρομο μόριο στην παραγωγή αναγωγικών μέσων, όπως η γλουταθειόνη ή η θειορεδοξίνη.⁴³ Αποκαλύπτεται, έτσι, η δράση του ενζύμου ως αντιοξειδωτικού παράγοντα, συνεισφέροντας στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, αφού η αναστολή αυτού συνεπάγεται την έμμεση αύξηση αναγωγικών παραγόντων προς αντιμετώπιση της υπάρχουσας οξειδωτικής κατάστασης. Αντίθετα, οι αναγωγικές συνθήκες διατηρούν ενεργό το ένζυμο και επάγουν τον καταβολισμό της κυστεΐνης.³⁶

Η ενεργότητα του 3MST φαίνεται, λοιπόν, να ρυθμίζεται σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, μέσα από μοριακές αλλαγές στη δομή του ενζύμου, επαγόμενες από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη δύο καταλοίπων κυστεΐνης, ενός στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και ενός στην επιφάνεια, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ανίχνευση τέτοιου είδους αλλαγών. Η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης 248 του ενεργού κέντρου μετατρέπεται σε σουλφονικό (MST-SSO⁻) ή άλλες οξειδωμένες μορφές (-SSO₃⁻, -SSO₂⁻, -SS-R) κάτω από οξειδωτικές συνθήκες, οδηγώντας σε αναστολή της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Η ύπαρξη κυστεΐνης στη θέση 263 στην επιφάνεια του ενζύμου (στους αρουραίους παρατηρείται και μια τρίτη κυστεΐνη στη θέση 154) έχει επίσης την ίδια λειτουργία. Κάτω από οξειδωτικές συνθήκες, τα αντίστοιχα αμινοξέα δύο ενζύμων 3MST σχηματίζουν διμερή μέσω ισχυρών δισουλφιδικών δεσμών. Η αναλογία διμερούς-μονομερούς μορφής του ενζύμου αλλάζει και το 3MST έτσι εισέρχεται στην ανενεργό του κατάσταση. Με σκοπό την επανεργοποίηση του ενζύμου, η δράση ορισμένων μόνο αναγωγικών, όπως της θειορεδοξίνης ή σε μικρότερο βαθμό, της προσθήκης διθειοθρεϊτόλης *in vitro*, μπορεί να επαναφέρει τη δραστηριότητα, σπάζοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς και επαναφέροντας τα κατάλοιπα της κυστεΐνης στην πρότερή τους κατάσταση.^{32,36,39,43} Καθίσταται σαφές, πως η επιρροή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου στη δραστηριότητα του ενζύμου συνδέεται με την κυτταρική ομοιόσταση και σε δεύτερο χρόνο, με σοβαρές ασθένειες που βάζονται από το χρόνιο οξειδωτικό στρες.⁴⁵

Βιοχημικές δράσεις

Εξετάζοντας το ένζυμο παραγωγής υδροθείου 3MST από μια βιοχημική σκοπιά, συμπεραίνουμε πως αυτό δρα τόσο στον καταβολισμό της κυστεΐνης, όσο και στην αποτοξίνωση από το κυάνιο. Επισημαίνεται, ακόμη, η οξειδοαναγωγική ιδιότητα του ενζύμου, αφού παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, η δραστηριότητα του ενζύμου αναστέλλεται και επάγεται η σύνθεση αναγωγικών μέσων.²⁴

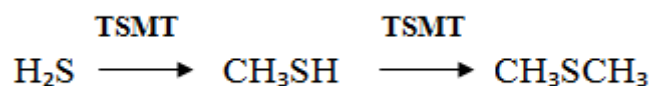
Έρευνες των τελευταίων χρόνων δείχνουν πως η παραγωγή υδροθείου στα μιτοχόνδρια με υπόστρωμα το 3MP, ενεργοποιεί την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και την παραγωγή ενέργειας. Το υδροθείο, έτσι φαίνεται να δρα ως δότης ηλεκτρονίων υποστηρίζοντας την παραγωγή ATP.²⁴

1.4. ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ H₂S

Το H₂S είναι ένα ασταθές μόριο με μικρό χρόνο ημιζωής -της τάξης των λεπτών-, τα επίπεδα του οποίου στον οργανισμό ρυθμίζονται φυσιολογικά από την ισορροπία των διαδικασιών σύνθεσης και καταβολισμού του αερίου.³ Συνεπώς, τα ένζυμα που έμμεσα ή άμεσα επηρεάζουν τη συγκέντρωση του διαβιβαστή είναι: CBS, CSE, 3-MST, ethylmalonic encephalopathy protein 1 (ETHE1), mitochondrial sulfide-quinone oxidoreductase (SQR) και cysteine dioxygenase (CDO).⁴⁶

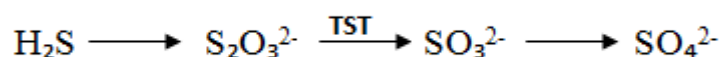
Οι βασικότεροι τρόποι καταβολισμού του υδροθείου περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση αυτού με τη μεθαιμοσφαιρίνη σχηματίζοντας τη θειοαιμοσφαιρίνη.⁴⁷ Παρουσιάζει, επίσης, αλληλεπιδράσεις με μέταλλα και δισουλφίδια μακρομορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση του υδροθείου με την αιμογλοβίνη προς σχηματισμό θειοαιμογλοβίνης.

Ένας άλλος τρόπος καταβολισμού του είναι η μεθυλίωση που υφίσταται από το ένζυμο S-μεθυλοτρανσφεράση θειολών (thiol S-methyltransferase, TSMT) προς μεθανοθειόλη και στη συνέχεια προς το λιγότερο τοξικό παράγωγο, διμεθυλοσουλφίδιο.^{1,28,54}



Εικόνα 8: Καταβολισμός υδροθείου από το ένζυμο TSMT

Τέλος, το H₂S οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια διαδοχικά σε θειοθειικό ιόν και έπειτα σε θειώδες με τη βοήθεια του ενζύμου ροδανάση (υπό την ισομορφή του thiosulfate cyanide sulfurtransferase, TST), με το τελικό προϊόν υπό φυσιολογικές συνθήκες να είναι το θειικό άλας.



Εικόνα 9: Μιτοχονδριακή οξείδωση του υδροθείου

Το μιτοχονδριακό ένζυμο αναγωγάση της κινόνης (sulfide: quinone reductase) παίζει επίσης καταλυτικό ρόλο στην οξείδωση του υδροθείου. Στα θηλαστικά, το υδρόθειο οξειδώνεται από το ένζυμο SQR και λειτουργεί σαν ανόργανο υπόστρωμα μεταφέροντας ηλεκτρόνιο στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.⁴⁸ Καθίσταται σαφές πως αλλαγές στα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης θα έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στο ποσοστό οξείδωσης του υδροθείου, καθώς και στις δράσεις του σηματοδοτικού αυτού μορίου και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου.⁴⁹ Ένα ακόμη ένζυμο που δύναται να επηρεάσει τον καταβολισμό του υδροθείου είναι το ETHE1 που φέρει σίδηρο και αποτελεί ένζυμο, η δράση του οποίου έπεται του SQR στην οξείδωση του υδροθείου στα μιτοχόνδρια.⁵⁰

Η ομοιόσταση της κυστεΐνης εξαρτάται από το ένζυμο CDO, το οποίο οξειδώνει τη σουλφυδρυλική ομάδα του αμινοξέος. Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι επηρεάζει εμμέσως τα επίπεδα υδροθείου, δεδομένου πως η κυστεΐνη αποτελεί υπόστρωμα για τα ένζυμα σύνθεσής του.²⁴

Το H₂S απομακρύνεται από τον οργανισμό είτε μέσω της εκπνοής ή μέσω των ούρων ως θειικό άλας – είτε ως ελεύθερο θειικό ιόν, είτε ως θειοθειικό – και στα κόπρανα ως ελεύθερο σουλφίδιο. Σημειώνεται πως το θειοθειικό είναι ιδιαίτερα σταθερό στο αίμα και τα ούρα, για αυτό και χρησιμοποιείται ως δείκτης δηλητηρίασης από θειούχα.¹⁰

1.5. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ H₂S

Στα βιολογικά συστήματα, οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το υδρόθειο μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Πρώτον, αντιδρά και εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Επίσης, συνδέεται με μόρια στο κέντρο των οποίων υπάρχουν μέταλλα και προκαλεί αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Τέλος, το υδρόθειο συμμετέχει στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών μέσω της

δημιουργίας περσουλφιδίου στα κατάλοιπα κυστεΐνης, αντίδραση γνωστή ως S-σουλφυδρυλίωση. Η επαγόμενη στερεοχημική αναδιάταξη των πρωτεϊνών και η υψηλή αντιδραστικότητα του περσουλφιδίων, λόγω της κατά κανόνα χημικής αστάθειας αυτών, προκαλεί αλυσιδωτές αντιδράσεις.¹⁰

Το υδρόθειο δρα ως σηματοδοτικό μόριο ρυθμίζοντας τη λειτουργία ενός μεγάλου αριθμού μοριακών στόχων, συμπεριλαμβανομένων των καναλιών ιόντων⁵¹, των κινασών⁵², καθώς και μεταγραφικών παραγόντων. Από το φάσμα αυτών των παραγόντων θα αναφέρουμε ορισμένους μόνο, ιδιαίτερα γνωστούς για τη συμμετοχή τους σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες του ανθρώπινου οργανισμού: NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK (c-JunNH2-terminal kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase), PKC (protein kinase C), Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), p53, mTOR (mechanistic target of rapamycin). Καθίσταται σαφές, λοιπόν, πως ο ρόλος του αερίου αυτού διαβιβαστή επεκτείνεται σε ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών όπως η φλεγμονή, η απόπτωση και γενικότερα ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταροπροστασία, ο μεταβολισμός, η γήρανση, η λειτουργία των αγγείων και πολλές άλλες. Τονίζεται πως οι λειτουργίες του υδροθείου διευρύνονται ακόμη περισσότερο αν συνεκτιμήσουμε την αλληλεπίδρασή του με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή αζώτου.⁵³

Οι δράσεις του εντοπίζονται σε διάφορα συστήματα στον οργανισμό, όπως το καρδιαγγειακό, το νευρικό, το ενδοκρινικό, το ανοσοποιητικό, το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό, το αναπαραγωγικό και το ουροποιητικό σύστημα.⁵⁴ Ακολουθώς αναλύονται μερικές μόνο από τις δράσεις του υδροθείου, με έμφαση στο καρδιαγγειακό σύστημα.

Όπως άλλωστε φαίνεται και από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιγράφονται ακολούθως, το υδρόθειο συχνά ασκεί τις φυσιολογικές ή παθοφυσιολογικές του δράσεις σε συνεργασία με τους άλλους δύο αέριους διαβιβαστές, το NO και το CO. Η συσχέτιση του H₂S με το CO είναι ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση της αίμης. Δεδομένου πως και τα τρία μόρια συνδέονται με την αιμογλοβίνη, ο κορεσμός της αίμης με τον ένα διαβιβαστή συνεπάγεται αυτόματα την αύξηση των συγκεντρώσεων των άλλων δύο στο πλάσμα και άρα, την εκδήλωση των βιολογικών τους δράσεων. Οι δράσεις, λοιπόν, κάθε διαβιβαστή, πρέπει να εκτιμώνται παράλληλα με τους υπόλοιπους προς ανίχνευση οποιασδήποτε συσχέτισης.³

1.5.1. ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΟΛΗ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

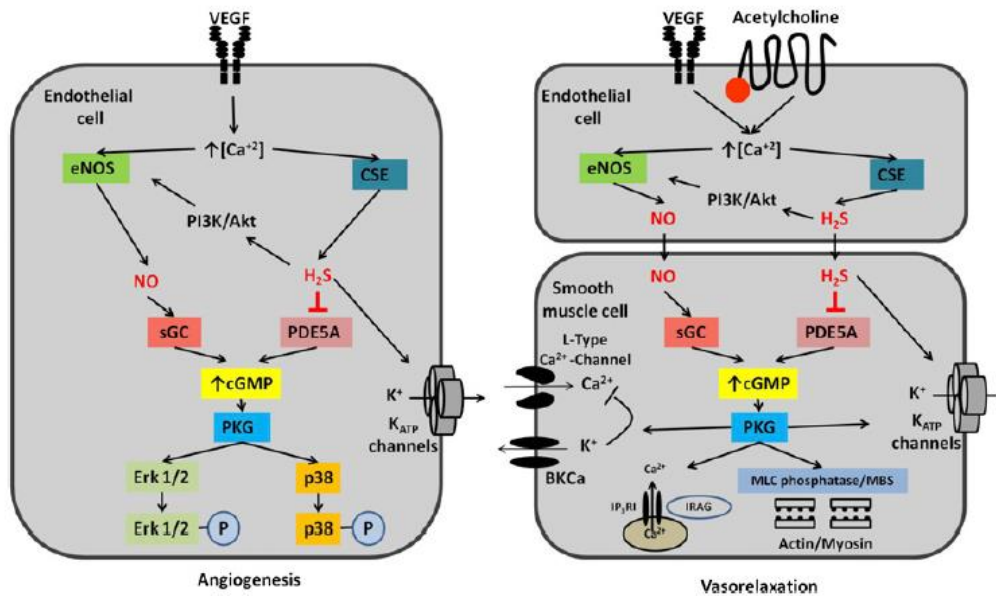
Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι για την επίτευξη των δύο αυτών δράσεων απαιτείται η συνέργεια του H₂S με έναν εξίσου σημαντικό αέριο διαβιβαστή, το NO.³

Το H₂S ασκεί αγγειοδιασταλτική και αγγειογενετική δράση μέσω του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG). Πιο αναλυτικά, η σύνδεση του VEGF ή της ακετυλοχολίνης στον υποδοχέα τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου και περαιτέρω την ενεργοποίηση τόσο της eNOS όσο και του CSE, οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων NO και H₂S αντίστοιχα. Ως γνωστόν, το NO ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση sGC, η οποία μετατρέπει το GTP σε cGMP. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G (PKG). Το H₂S επιδρά θετικά στο μονοπάτι αυτό, αφενός μέσω της ενεργοποίησης της PI3K/Akt, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την eNOS και αφετέρου μέσω της αναστολής του ενζύμου καταβολισμού του cGMP, δηλαδή της PDE5.¹⁰

Με την ενεργοποίηση της PKG ακολουθεί διέγερση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) κινασών, όπως οι ERK και p-38, με αποτέλεσμα την αγγειογένεση. Οι τελευταίες εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της κυτταρικής διαφοροποίησης και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου.^{1,8,13,55}

Στα λεία μυϊκά κύτταρα, η διέγερση της PKG συνεπάγεται ενεργοποίηση της φωσφατάσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC), η οποία αποφωσφορυλιώνει τη μυοσίνη, με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση αγγειοδιαστολής.

Σημειώνεται τέλος, ότι στις δύο αυτές δράσεις συμβάλλει και η ενεργοποίηση των K_{ATP} καναλιών από το H₂S μέσω σουλφυδρυλίωσης.⁵⁵



Εικόνα 10: Μηχανισμοί αγγειογένεσης-αγγειοδιαστολής⁵⁵

1.5.2. ΑΝΤΙΜΙΤΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Σε αντίθεση με την αγγειογενετική δράση που παρουσιάζει το υδρόθειο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λεία μυϊκά κύτταρα παρουσιάζει αντιμιτογόνο και αποπτωτική δράση. Αυτές μεσολαβούνται μέσω της ενεργοποίησης της ERK και της επακόλουθης ενεργοποίησης κασπασών -κυρίως της κασπάσης 3- οι οποίες αποτελούν σημαντικούς αποπτωτικούς παράγοντες.⁵⁷

1.5.3. ΧΡΟΝΟΤΡΟΠΟΣ ΚΑΙ ΙΝΟΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗ

Σύμφωνα με έρευνες έχει παρατηρηθεί αρνητική χρονότροπος δράση του H₂S μέσω της ανασταλτικής του δράσης στα βηματοδοτικά κύτταρα. Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης δράσης έγκειται πιθανώς στην ενεργοποίηση των K_{ATP} καναλιών, που οδηγεί περαιτέρω σε κλείσιμο των L-τύπου καναλιών ασβεστίου, μείωση της εισόδου ασβεστίου και άρα, αναστολή της μυϊκής συστολής.^{1,58}

Μέσω του ίδιου μηχανισμού έχει παρατηρηθεί και αρνητική ινότροπος δράση του αέριου διαβιβαστή σε in vitro και in vivo πειράματα, δράση ευεργετική σε μοντέλο ισχαιμίας/επαιμιάτωσης.^{1,59,60} Η προστασία που ασκεί το υδρόθειο κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαιμιάτωσης οφείλεται και στην ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής NO συνθάσης και τη συνεπακόλουθη αύξηση του παραγόμενου αέριου διαβιβαστή, NO.¹⁰ Ωστόσο, η αρνητική χρονότροπος και ινότροπος δράση του H₂S δεν υποστηρίζεται από όλες τις διεξαχθείσες μελέτες.¹

1.5.4. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ

Η αντιφλεγμονώδης δράση του H₂S έγκειται στην ικανότητά του να αναστέλλει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση του CSE (CSE^{-/-}), όπου παρατηρήθηκε αυξημένη προσκόλληση των λευκοκυττάρων και αύξηση της φλεγμονής. Στα πειράματα αυτά, η χορήγηση εξωγενούς H₂S είχε ως αποτέλεσμα την επιβίωση αυτών, καθιστώντας το H₂S σημαντικό αντιφλεγμονώδη παράγοντα.¹³ Το υδρόθειο μπορεί ακόμη να αυξορυθμίσει την έκφραση αντιφλεγμονωδών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, όπως είναι αυτά που κωδικοποιούν την αιμοξυγενάση HO1. Μέσω της αιμοξυγενάσης πυροδοτείται η παραγωγή ενός ακόμη αέριου διαβιβαστή, του CO, γνωστού για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του μέσω αναστολής του NF-κB και αυξορύθμισης της iNOS.^{10,61} Η επουλωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του μορίου έγκειται και στην ενεργοποίηση των K_{ATP} διαύλων.⁹

Σημειώνεται πως η αντιφλεγμονώδης δράση του υδροθείου παρατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αέριου διαβιβαστή και έρχεται σε αντίθεση με τις προφλεγμονώδεις ενέργειες που παρατηρούνται στα αυξημένα επίπεδα αυτού.¹⁰

1.5.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Το H₂S αποτελεί ισχυρό αναγωγικό μέσο, ιδιότητα που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με οξειδωτικούς παράγοντες. Έχει την ικανότητα να ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς και να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, συμβάλλοντας έτσι στην αντιοξειδωτική δράση του οργανισμού.¹ Ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αντιοξειδωτική δράση είναι η ενεργοποίηση του Nrf2 παράγοντα, μέλους της οικογένειας NF-E2. Η ενεργοποίησή του από το H₂S προκαλεί το διαχωρισμό του από τον προσκολλημένο σε αυτό αναστολέα του - Kelch associated protein 1- και τη μετατόπισή του από το κυτοσόλιο στον πυρήνα, όπου συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων αντιοξειδωτικών μορίων. Έτσι, επιτυγχάνεται η αυξορύθμιση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, όπως η HO-1 και η θειορεδοξίνη 1, που καταπολεμούν οξειδωτικούς παράγοντες.^{1,13} Παράλληλα, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης μέσω της ενεργοποίησης της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης.^{14,62} Αξίζει να επισημάνουμε πως τα επίπεδα γλουταθειόνης στον οργανισμό βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη τάξη μεγέθους σε σχέση με τον αναγωγικό παράγοντα υδρόθειο, οπότε η αντιοξειδωτική δράση του διαβιβαστή εναπόκειται κυρίως στην αυξορύθμιση της παραγωγής γλουταθειόνης.¹⁰

1.5.6. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ-ΕΝΕΡΓΕΙΑ

Το H₂S ρυθμίζει την παραγωγή ενέργειας μειώνοντας τη μιτοχονδριακή αναπνοή, μέσω αναστολής της κυτοχρωμικής οξειδάσης C (Complex IV), ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια.⁶³ Η μείωση αυτή λαμβάνει χώρα σε υψηλές κυρίως συγκεντρώσεις του αερίου διαβιβαστή και οδηγεί σε ελάττωση του κυτταρικού μεταβολισμού και της κατανάλωσης του οξυγόνου, κυτοπροστασία και μια κατάσταση που προσομοιάζει τη χειμερία νάρκη («suspended animation»). Χάρη σε αυτή του τη δράση, το υδρόθειο ασκεί ορισμένες από τις φαρμακολογικές, καθώς επίσης και ορισμένες από τις τοξικές του δράσεις.⁶⁴ Ωστόσο, το υδρόθειο δε δρα μόνο ως αναστολέας της μιτοχονδριακής λειτουργίας, αλλά αντιθέτως, μπορεί να δράσει και ως δότης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα στο σύμπλεγμα II.⁶⁵ Η αντίθετη αυτή δράση παρατηρείται συνήθως σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αερίου. Σημειώνεται πως κύριο ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση κατέχει το ένζυμο βιοσύνθεσης υδροθείου, 3MST, όπως αναλύθηκε προηγουμένως σχετικά με την οξειδοαναγωγική ρύθμιση που υφίσταται.⁴⁵

1.6. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο ρόλος του υδροθείου στη διατήρηση της φυσιολογίας του οργανισμού γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτός κατά τη συσχέτιση των επιπέδων του αερίου διαβιβαστή με παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Η ενδογενής σύνθεση υδροθείου παρατηρείται μειωμένη κατά τη γήρανση, σε περιπτώσεις καρδιολογικής ασθένειας, αλλά και σε χρόνια φλεγμονή. Ο διαβήτης, καθώς επίσης και αναπνευστικά προβλήματα συμπεριλαμβανομένου του άσθματος, αποτελούν ασθένειες στις οποίες παρατηρούνται επίσης μειωμένα επίπεδα του αερίου.¹⁰

Τα ένζυμα βιοσύνθεσης του υδροθείου συχνά ευθύνονται για τις ανωτέρω αλλαγές στο παραγόμενο υδρόθειο. Σημειακές μεταλλάξεις –συνώνυμες ή μη συνώνυμες- που λαμβάνουν χώρα σε κωδικεύουσες περιοχές των γονιδίων συχνά αποτελούν το λόγο αυτών των αλλαγών. Η επίδραση των ενζύμων βιοσύνθεσης του αερίου διαβιβαστή στην παθοφυσιολογία επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα, όπου αποσιώπηση ή αντίθετα υπερέκφραση ενός γονιδίου ενζύμου παραγωγής υδροθείου οδήγησε σε παθοφυσιολογικούς φαινοτύπους.⁶⁶⁻⁷³

Πιο αναλυτικά, για το ένζυμο CBS έχουν ταυτοποιηθεί περί τις 150 μεταλλάξεις, πολλές εκ των οποίων επηρεάζουν δυσμενώς τη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι ασθένειες με τις οποίες έχουν συνδεθεί είναι η υπέρταση, ο αυξημένος κίνδυνος

εγκεφαλικού επεισοδίου, ακόμα και ο καρκίνος του μαστού. Η ανεπάρκεια του συγκεκριμένου ενζύμου έχει συνδεθεί με φαινοτύπους όπως η πνευματική καθυστέρηση, η εξάρθρωση του φακού στα μάτια και οι σκελετικές διαταραχές. Μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα που παρουσίαζαν έλλειψη του εν λόγω ενζύμου παρουσίαζαν αλωπεκία, οστεοπόρωση, ενώ σημαντικό ποσοστό εξ' αυτών απεβίωσε λίγο χρόνο μετά τη γέννησή τους.⁹ Η ανεπάρκεια στο ένζυμο CBS οδηγεί επίσης στη γνωστή ασθένεια ομοκυστεϊνουρία, κατά την οποία ανιχνεύονται αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεϊνης και μεθειονίνης στο αίμα των ασθενών και μειωμένα επίπεδα κυστεϊνης.²⁴

Αντίστοιχου ενδιαφέροντος είναι οι πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί για το γονίδιο που κωδικοποιεί το δεύτερο ένζυμο παραγωγής υδροθείου, το CSE. Μεταλλάξεις στο εν λόγω ένζυμο έχουν συνδεθεί με την υπέρταση, την προεκλαμψία, τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, αλλά και την κυσταθεινουρία, μια ελάχιστα κατανοητή ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα.⁷⁴ Η υπερομοκυστεϊναιμία, επίσης, η οποία έχει κατηγορηθεί για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών και άλλων νοσημάτων, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή H₂S.^{25,75,76-80} Αξίζει να σημειωθεί πως αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν συσχετίσει την αρνητική τους επίδραση στην κινητική του ενζύμου με διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.²⁴

Οι πολυμορφισμοί που αφορούν στο τρίτο ένζυμο βιοσύνθεσης του αέριου διαβιβαστή, το 3MST, είναι μικρότερου αριθμού σε σχέση με αυτούς των δύο άλλων ενζύμων. Υπάρχουν δεδομένα σχετικά με μη νοηματικές ('nonsense') μεταλλάξεις που οδηγούν σε εξαιρετικά μικρότερες και άρα, μη δραστικές πρωτεΐνες, η συσχέτιση όμως αυτών με κάποιο φαινότυπο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.²⁴ Ορισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο 3MST έχουν συνδεθεί με μία εκ γενετής ασθένεια του μεταβολισμού, γνωστή και ως mercaptolactate-cysteine disulfiduria, κατά την οποία παρατηρείται παντελής ή εν μέρει έλλειψη του ενζύμου.¹⁷ Η νόσος αυτή έχει συνδεθεί με διαταραχές συμπεριφοράς, όπως η πνευματική καθυστέρηση, η υποκινητικότητα και οι επιληψίες τύπου 'grand mal'.^{32,81} Εξαιτίας της μειωμένης σύνθεσης του ενζύμου, το υπόστρωμα, 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό, καταλύεται από τη δεϋδρογενάση του θειολακτικού προς παραγωγή θειολακτικού, για αυτό και στα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου περιλαμβάνεται η υπερέκκριση του αναφερόμενου μορίου στα ούρα. Σημειώνεται ακόμη πως σε μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια που παρουσίαζαν έλλειψη του 3MST ενζύμου, παρατηρήθηκε συμπεριφορά χαρακτηριζόμενη ως 'αγχώδης'. Τα αποτελέσματα αυτών ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα σχετικά με την αύξηση των επιπέδων της σεροτονίνης και του υποδοχέα της, 5HT_{2A} στον ιππόκαμπο, χωρίς όμως η συσχέτιση με το ένζυμο παραγωγής υδροθείου να έχει διαλευκανθεί πλήρως.³²

Θεωρείται πως οι διαταραχές στη συμπεριφορά και η πνευματική καθυστέρηση μπορούν να αποδοθούν στην απώλεια της δράσης του 3MST τόσο ως αντιοξειδωτικό ένζυμο, όσο και ως ένζυμο παραγωγής διαφόρων μορφών υδροθείου.⁸¹ Από την άλλη μεριά, αύξηση της δραστηριότητας του εν λόγω ενζύμου παρατηρείται σε ανθρώπινα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά και σε ερυθροκύτταρα ασθενών με polycythemia vera. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανακάλυψη αναστολέων θα μπορούσε να αποδειχθεί σωτήρια.³⁸

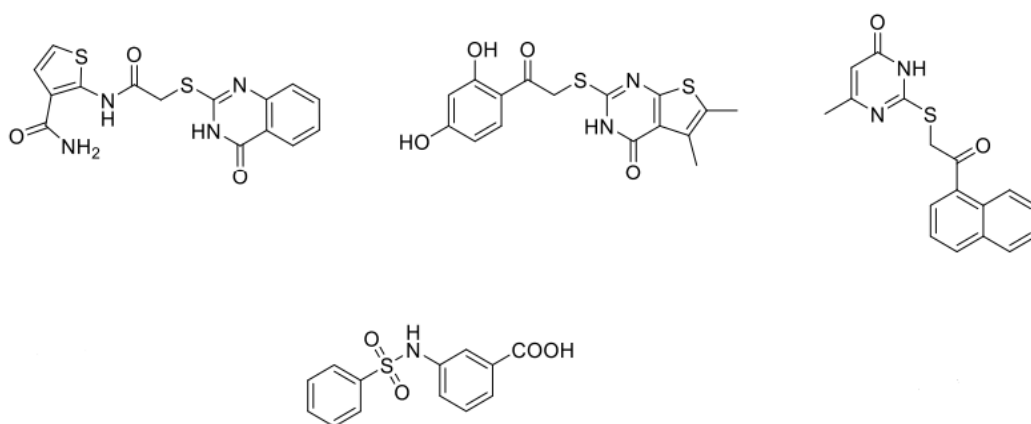
1.7. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η ανακάλυψη μορίων με ανασταλτική δράση επί των ενζύμων παραγωγής υδροθείου είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο στη βαθύτερη κατανόηση των δράσεων του αέριου διαβιβαστή, όσο και στην αποκρυπτογράφηση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει. Η χρήση των αναστολέων σε *in vivo* πειράματα, καθώς και η έρευνα σε διαγονιδιακά ζώα που παρουσιάζουν έλλειψη ενός μόνο ενζύμου βιοσύνθεσης του υδροθείου έχει οδηγήσει στο χαρακτηρισμό φαινοτύπων, ιδιαίτερα σημαντικών για τη μετέπειτα έρευνα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως οι αναστολείς που είναι μέχρι σήμερα διαθέσιμοι στερούνται υψηλής εκλεκτικότητας και δυναμικής, γεγονός που καθιστά την ανακάλυψη νεότερων μορίων απαραίτητη.³

Όσον αφορά στους αναστολείς που έχουν χρησιμοποιηθεί φαρμακολογικώς σε σχέση με το ένζυμο παραγωγής υδροθείου CSE, αξίζει να τονίσουμε πως είναι αρκετοί – ειδικά σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα σύνθεσης του αέριου διαβιβαστή. Ένας από τους συνήθεις χρησιμοποιούμενους αναστολείς είναι το DL-propargylglycine (PAG)⁸³, το οποίο προσδένεται μη αντιστρεπτά στο ένζυμο, αποκλείοντας την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο.⁸² Το PAG, όπως και ένας άλλος αναστολέας του εν λόγω ενζύμου, το β-cyanoalanine BCA, δεν είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί και απαιτούν σχετικά αυξημένες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί ικανοποιητική αναστολή, αφού εμφανίζουν περιορισμένη διάχυση διαμέσου της μεμβράνης.^{3,10} Ο αναστολέας aminooxyacetic acid (AOAA) έχει δειχθεί από αρκετές έρευνες πως είναι εκλεκτικός αναστολέας του ενζύμου CBS⁸⁴⁻⁸⁶, ωστόσο η εκλεκτικότητα αυτή αμφισβητείται από έρευνες με ανασυνδυασμένο ένζυμο.⁸⁷ Το μόριο αυτό φαίνεται να αποτελεί αναστολέα όλων των ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη. Στα μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς του CBS συγκαταλέγονται επίσης τα hydroxylamine (HA), trifluoroalanine.

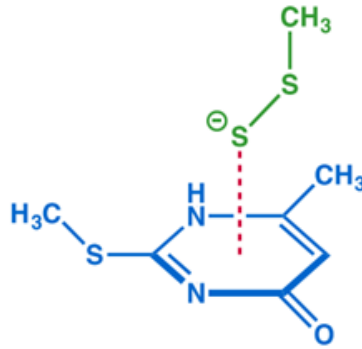
Το ένζυμο παραγωγής υδροθείου που ανακαλύφθηκε τελευταίο είναι και αυτό που στερείται εκτεταμένης βιβλιογραφίας σχετικά με την ύπαρξη αναστολέων. Το ένζυμο

3MST αναστέλλεται από το L-aspartate εμμέσως, αφού το μόριο αυτό αναστέλλει το προηγούμενο ένζυμο στην πορεία βιοσύνθεσης του υδροθείου, το CAT.⁸⁸ Η ενεργότητα της αμινοτρανσφεράσης ρυθμίζεται επίσης από τη συγκέντρωση Ca^{2+} , δεδομένου πως υψηλή συγκέντρωση των ιόντων αυτών αναστέλλει την παραγωγή του διαβιβαστή. Μόρια με δομική συγγένεια με το υπόστρωμα του ενζύμου, όπως τα pyruvate, phenylpyruvate, oxobutyrate, και oxoglutarate, έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως αναστολείς του 3MST.⁸⁹⁻⁹¹ Όμως, καμία από τις αναφερθείσες ενώσεις δεν είναι κατάλληλη για πειράματα, που θα μπορούσαν να ρίξουν φως στο βιολογικό ρόλο του εν λόγω ενζύμου. Πρόσφατα, έπειτα από πειράματα διαλογής υψηλής απόδοσης ανάμεσα από χιλιάδες ενώσεις, οι ερευνητές Hanaoka et al. κατέληξαν σε τέσσερις ουσίες, οι οποίες παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά αναστολής σε ιδιαίτερα μικρή συγκέντρωση, της τάξης των μM . Τα μόρια αυτά παρουσίαζαν υψηλή εκλεκτικότητα για το 3MST, σε σχέση με τα άλλα δύο ένζυμα παραγωγής υδροθείου και τη ροδανάση, με την οποία ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια. Αξίζει να σημειωθεί πως οι τρεις από τους τέσσερις αναστολείς έμοιαζαν δομικά λόγω του αρωματικού δακτυλίου πυριμιδινόνης με πλευρική ομάδα θειοκαρβονυλίου.³⁸



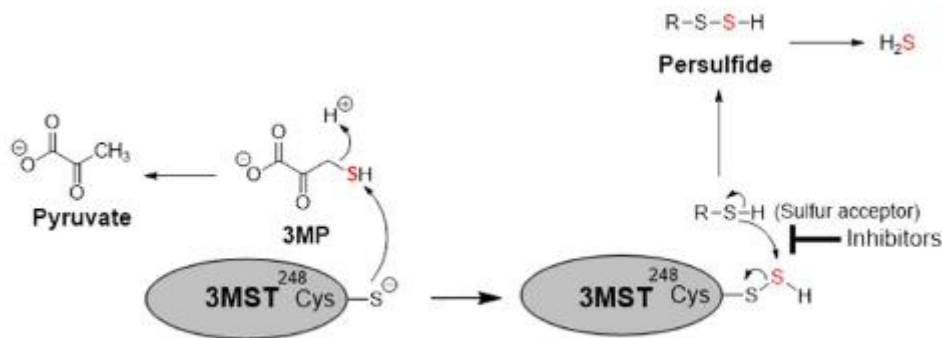
Εικόνα 11: Μόρια με ανασταλτική δράση επί του ενζύμου 3MST³⁸

Περαιτέρω έρευνα προς διαλεύκανση του μηχανισμού βάσει του οποίου επιτυγχάνεται η ανασταλτική δράση των καινοτόμων αυτών δομών, αποκάλυψε πως στόχος των ενώσεων αυτών αποτελεί η δομή περσουλφιδίου που σχηματίζεται στην κυστεΐνη 248 του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Φαίνεται πως ο αρωματικός δακτύλιος της πυριμιδίνης αλληλεπιδρά σε μία κάθετη διεύθυνση με τη δομή περσουλφιδίου, παρά τη σχετικά μεγάλη απόσταση. Η ισχυρή αλληλεπίδραση αυτή χαρακτηρίστηκε ως ηλεκτροστατικής φύσεως μεταξύ του σχηματισθέντος ανιόντος του περσουλφιδίου και του θετικά φορτισμένου άνθρακα του καρβονυλίου της δομής της πυριμιδίνης.³⁸



Εικόνα 12: Μοντέλο αλληλεπίδρασης του αρωματικού δακτυλίου του αναστολέα με τη δομή περσουλφιδίου του ενζύμου³⁸

Με αυτόν τον τρόπο, η ένωση-αναστολέας ‘κλειδώνει’ το ένζυμο στη δομή περσουλφιδίου και δεν επιτρέπει την πρόσδεση μιας ένωσης-δέκτη, ώστε να γίνει η μεταφορά του θείου από το περσουλφίδιο σε αυτήν και εν τέλει, να απελευθερωθεί ο αέριος διαβιβαστής.³⁸



Εικόνα 13: Πιθανός μηχανισμός ανασταλτικής δράσης των καινοτόμων ενώσεων³⁸

Ο μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων αυτών, καθώς και η προηγούμενη γνώση σχετικά με τη σταθερότητα του σχηματισθέντος περσουλφιδίου κατά την καταλυτική αντίδραση του ενζύμου, ισχυροποιούν τη θέση πως οι επίδοξοι αναστολείς, καλό είναι να σχεδιάζονται βάσει αυτής της δομής του ενζύμου, με την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου ως περσουλφίδιο.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2η :
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ

Το H_2S αποτελεί τον τρίτο αέριο διαβιβαστή που παράγεται ενδογενώς, με κύρια ένζυμα σύνθεσής του τη β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS) και τη γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE). Το τρίτο ένζυμο σύνθεσης, η 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θεοτρανσφεράση, ταυτοποιήθηκε σχετικά πρόσφατα και η σχετική βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Η αναζήτηση, λοιπόν, ενισχυτών, αλλά κυρίως αναστολέων της ενζυμικής του δραστηριότητας αποτελεί ένα πεδίο έρευνας μέχρι στιγμής ελάχιστα εξερευνημένο και παράλληλα πολλά υποσχόμενο.

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η βελτιστοποίηση και κατάλληλη τροποποίηση της ευρέως χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου 'methylene blue', με στόχο τη διερεύνηση της κινητικής του ενζύμου 3MST. Σε δεύτερο επίπεδο, επιδιώκουμε τη μελέτη μορίων που ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών ως αναστολείς του εν λόγω ενζύμου. Σημειώνεται πως ο πρώτος αξιόλογος αναστολέας του ενζύμου 3MST δημοσιεύθηκε πρόσφατως, γεγονός που αποδεικνύει το τεράστιο μέλλον που ανοίγεται σχετικά με την επίδραση του λιγότερο μελετημένου ενζύμου παραγωγής υδροθείου τόσο στη φυσιολογία, όσο και στην παθοφυσιολογία. Η ανακάλυψη μορίων με ανασταλτική δράση επί του ενζύμου ή έστω 'μορίων-οδηγών' που θα χρησιμοποιηθούν για τη σχεδίαση ισχυρότερων αναστολέων, αποτελεί μεγάλο επίτευγμα που πρέπει να αξιοποιηθεί εγκαίρως και καταλλήλως σε μελέτες τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*.

2.2. ΥΛΙΚΑ

2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

• Η βακτηριακή σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του ενζύμου h3MST ήταν *Escherichia coli* BL21(DE3) Codon Plus.

• Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα pGEX-KG με την αλληλουχία του ενζύμου h3MST συντηγμένη με τη GST.

• Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε μικρή και μεγάλη κλίμακα ήταν το Luria-Bertani (L.B.) έτοιμο μίγμα σε σκόνη της εταιρείας Fischer Scientific, σύστασης: 1% w/w tryptone, 0,5% w/w yeast extract, 1% w/w NaCl.

• Το άγαρ για τη στερεή καλλιέργεια ήταν της εταιρείας Fischer Scientific, ενώ για τη δημιουργία αποθεμάτων χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη Fluka.

• Τα αντιβιοτικά που προστέθηκαν στις καλλιέργειες ήταν η αμπικιλίνη της εταιρείας Applichem Biochemica περιεκτικότητας 100 mg/mL σε 100% dH₂O, καθώς και η χλωραμφαινικόλη περιεκτικότητας 0,34 mg/mL σε 100% αιθανόλη (φιλτράρονται και αποθηκεύονται στους -20°C).

• Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης έγινε με τη χρήση του παράγοντα IPTG (Isopropyl-1-thio-β-Dgalactoside) της εταιρείας Applichem Biochemica. Δημιουργήθηκε διάλυμα IPTG 1M: 2,38 g / 10 mL ddH₂O, η αποθήκευση του οποίου έγινε στους -20°C.

• Για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS και της χρώσης-απόχρωσης της πηκτής, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα: τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), ακρυλαμίδιο 30%, SDS από την εταιρεία Biorad, Ammonium Persulfate (APS), αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ της εταιρείας Applichem Biochemica, έγχρωμοι μάρτυρες διαφόρων μοριακών μεγεθών από την εταιρεία ThermoScientific.

- Διάλυμα APS 10%: 1 g APS σε 10 mL ddH₂O (αποθήκευση στους -20°C)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων για πρωτεΐνες 2x Laemmli buffer με σύσταση: 4 mL γλυκερόλης, 8mL 10% SDS, 2,5 mL 1M Tris-HCl pH 6,8, 400 uL 1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 2 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 3,1mL dH₂O
- Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-SDS διαχωρισμού 12,5%, σύστασης: 3,1 mL ddH₂O, 4,2 mL ακρυλαμιδίου 30%, 2,5 mL Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 100 uL 10% w/v SDS, 100 uL APS 10%, 4 uL TEMED

- Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-SDS συμπύκνωσης, σύστασης: 2,1 mL ddH₂O, 500 uL ακρυλαμιδίου 30%, 380 uL Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 30 uL 10% w/v SDS, 30 uL APS 10%, 3 uL TEMED
 - Διάλυμα ηλεκτροφόρησης, σύστασης 25 mM Tris-base, 192 mM γλυκίνη, 0,1% SDS, ddH₂O q.s. 1L
 - Διάλυμα χρωματισμού της πηκτής πολυακρυλαμιδίου σύστασης 0,5g Coomassie Blue R-250 διαλυμένο σε 90mL μεθανόλη, 20mL οξικό οξύ και 90mL dH₂ O
 - Διάλυμα αποχρωματισμού της πηκτής πολυακρυλαμιδίου: 100mL ισοπροπανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 800mL dH₂ O
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1x PBS, σύστασης 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH =8
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης (διάλυμα έκλουσης): 10mM GSH (Sigma), 50mM Tris-HCl, pH=8 (φυλάσσεται στους 4°C και χρησιμοποιείται εντός μίας ώρας από την ώρα παρασκευής του).
- Το μίγμα αναστολέων πρωτεασών που χρησιμοποιήθηκε ήταν Protease Inhibitor Coctail Complete Mini της εταιρείας Roche.
- Για την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε στήλη GSTrap FF 5 mL της εταιρείας GE Healthcare, όπου η γλουταθειόνη είναι ακινητοποιημένη σε σεφαρόζη.
- Για την αλλαγή διαλύματος της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν dialysis membranes 14.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off) από την εταιρεία Roth.
- Διάλυμα φωσφορικών (Sodium Phosphate Buffer) 1M: 93,2 mL Na₂HPO₄ 1M, 6,8 mL NaH₂PO₄ 1M, pH= 8,2
 - Διάλυμα DTT 1M: 0,1542 g σε 1 mL ddH₂O (αποθήκευση στους -20°C)
- Για την πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη (BSA) από την εταιρεία Appllichem Biochemica.
- Για τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:
- Na₂S (ALDRICH)
 - Διάλυμα ZnAc 1%: 0,5g σε 50 mL ddH₂O (SIGMA)
 - Διάλυμα TCA 20%: 10g σε 50 mL ddH₂O(SIGMA)
 - Διάλυμα DPD 20mM σε HCl 7,2M (SIGMA)
 - Διάλυμα FeCl₃ 30mM σε HCl 1,2M (SIGMA)
- Οι τετρακυκλίνες που ελέγχθησαν ως αναστολείς του ενζύμου ήταν της εταιρείας Sigma Aldrich με τους κωδικούς που αναφέρονται κάτωθι. Τα διαλύματα των

τετρακυκλινών παρασκευάζονται φρέσκα σε ddH₂O σε συγκέντρωση 10mM, με ήπια θέρμανση και προστασία από το φως, εάν απαιτείται.

- Chlortetracycline hydrochloride C4881
- Demeclocycline hydrochloride D6140
- Tetracycline hydrochloride T7660
- Minocycline hydrochloride M9511
- Oxytetracycline hydrochloride 05875
- Doxycycline hyclate D9891

2.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Επωαστήρας για καλλιέργεια βακτηρίων υπό ανάδευση, C25KC, New Brunswick Scientific, Edison
- Φυγόκεντρος KR 25 (JOUAN)
- Φυγόκεντρος EBA 12, E1175 (Hettich)
- Φυγόκεντρος 5415C (Eppendorf)
- Φυγόκεντρος RC 5C PLUS (Sorvall)
- Μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων UP 200s, Ultraschallprozessor, dr.hielscher
- Φασματοφωτόμετρο UV/Vis 1240, Shimadzu
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών της Biorad (POWER PAC 300)
- Περισταλτική αντλία P-1 της Pharmacia
- Υδατόλουτρο
- Μετρητής απορρόφησης στα 655nm και 750nm EL800 της Biotek
- Πιπέτες Gilson για τη μετάγγιση υγρών από 0,1 uL έως 1 mL
- Τρυβλία petri για στερεές καλλιέργειες
- Πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου μιας χρήσης 15 και 50 mL της εταιρείας Sarstedt
- Πλαστικά σωληνάρια 1,5 mL και 2 mL (eppendorf) της εταιρείας Sarstedt
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης
- Κωνικές φιάλες των 2 L
- Φίλτρα Whatman με διάμετρο πόρου 0,2μm
- Σύριγγες μιας χρήσης

2.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Αν και τα θετικά στοιχεία της χρήσης βακτηριακών κυττάρων προς έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι πολλά, συμπεριλαμβανομένου της απλότητας της τεχνικής, της ταχύτητας και του χαμηλού κόστους αυτής, εντούτοις ορισμένα αρνητικά σημεία είναι αρκετά για να προκαλέσουν δυσεπίλυτα προβλήματα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η παραγωγή σε μικρό βαθμό της πρωτεΐνης-στόχου ή η περικύκλωση αυτής στα λεγόμενα ‘inclusion bodies’ κατά τη διάρκεια της επώασης.⁹²

Γνωρίζουμε από προηγούμενη πρακτική του εργαστηρίου πως η πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε περιέχεται σε inclusion bodies. Προς αντιμετώπιση ή έστω μείωση αυτού του προβλήματος, η επιλογή της βακτηριακής σειράς, του φορέα κλωνοποίησης και ολόκληρου του πρωτοκόλλου έκφρασης έγινε με ιδιαίτερη φροντίδα, με σκοπό την επίτευξη του στόχου: την παραλαβή του ενζύμου στην καλύτερη δυνατή ποσότητα και ποιότητα.

2.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ-ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Για την έκφραση του ενζύμου h3MST χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια pGEX-KG με ενσωματωμένη την αλληλουχία GST-h3MST, τα οποία είχαν εισαχθεί σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* της σειράς BL21 DE3 codon plus. Σημειώνεται πως ο μετασχηματισμός των εν λόγω κυττάρων με το πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία της επιθυμητής πρωτεΐνης είχε ήδη πραγματοποιηθεί από προηγούμενη πρακτική του εργαστηρίου, οπότε το αντίστοιχο απόθεμα γλυκερόλης φυλάσσονταν στους -80° C.

Προσθήκη σήμανσης στην αλληλουχία της επιθυμητής πρωτεΐνης

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση σημάτων ξεκίνησε πολύ πρόσφατα, το 1994, η επανάσταση όμως που έφερε στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών οδήγησε στην ταχεία ανάπτυξη της τεχνικής. Η τεχνική αυτή βοήθησε στην επίλυση πλειάδας εμποδίων, όπως η αύξηση της έκφρασης και διαλυτότητας της πρωτεΐνης-στόχου, η απλοποίηση των διαδικασιών της πρωτεϊνικής απομόνωσης, η αποτροπή προβλημάτων πρωτεόλυσης και απώλειας της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης και γενικότερα, η αύξηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας έκφρασης.⁹³

Τα μεγάλα μόρια, όπως είναι και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης, Glutathione-S-Transferase (GST), της οποίας το μοριακό βάρος υπολογίζεται στα 27kDa,

χρησιμοποιούνται συνήθως σε προκαρυωτικά συστήματα, όπως αυτό των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*, προς βελτίωση της διαλυτότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη GST ανήκει στην οικογένεια των αποτοξινωτικών ενζύμων, τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από τη δράση ξενοβιοτικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν τη σύνδεση της γλουταθειόνης με τους επιβλαβείς παράγοντες, αδρανοποιώντας τους.⁹⁴ Η GST θεωρείται ότι μπορεί να 'παρασύρει' την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εν διαλύση, για αυτό και επιλέγεται συχνά σε περιπτώσεις όπου η η πρωτεΐνη-στόχος παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα και εμφανίζεται σε 'inclusion bodies' κατά την επαγωγή της έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα.⁹³

Η σήμανση της πρωτεΐνης μπορεί συχνά να έχει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά στη διαλυτότητα αυτής, ωστόσο η εν λόγω τεχνική δεν αποτελεί πανάκεια. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το ένζυμο 3MST εξακολουθεί να σχηματίζει inclusion bodies, παρά την ενσωμάτωση της αλληλουχίας GST. Πρόσθετα μέτρα, λοιπόν, έπρεπε να ληφθούν, στοχεύοντας παράλληλα στις συνθήκες της καλλιέργειας. Η μείωση της θερμοκρασίας κατά την επαγωγή της έκφρασης είναι μια αρκετά γνωστή και αποτελεσματική τεχνική, η οποία αναλύεται στη συνέχεια.⁹³

Η σήμανση παρουσιάζει επιπλέον οφέλη, με κύριο την εύκολη και αποτελεσματική απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η έκλυση αυτής γίνεται κάτω από ήπιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας στο διάλυμα έκλυσης ανηγμένη γλουταθειόνη.⁹² Κατ'αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη διατηρεί την τρισδιάστατη δομή της και άρα, τη βιολογική της δραστηριότητα, χωρίς να απαιτώνται περαιτέρω επισφαλείς και χρονοβόρες διαδικασίες αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, έπειτα από τη χρήση ισχυρών αποδιατακτικών παραγόντων.⁹³

Επιλογή του φορέα κλωνοποίησης

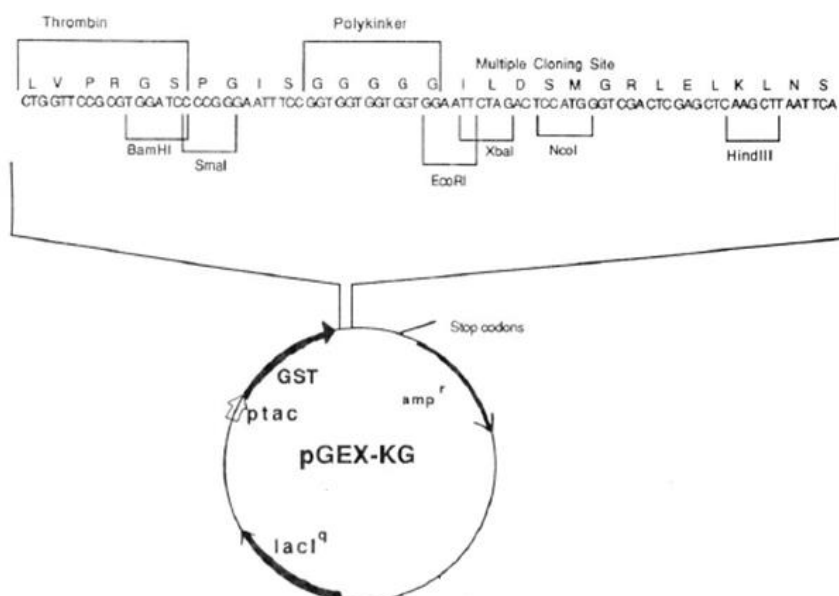
Ως φορείς κλωνοποίησης για την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pGEX-KG. Οι φορείς αυτοί δίνουν τη δυνατότητα έκφρασης και παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα της πρωτεΐνης-στόχου. Στη συνέχεια θα αναλυθούν ορισμένες βασικές περιοχές του πλασμιδίου.

Χρησιμοποιώντας ως φορείς κλωνοποίησης τα πλασμίδια pGEX-KG, η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης επιτυγχάνεται μέσω του tac προαγωγέα. Αξίζει να σημειωθεί πως οι φορείς κλωνοποίησης pGEX επιτρέπουν την ενσωμάτωση της επιθυμητής αλληλουχίας και την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης συντηγμένη με την πρωτεΐνη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, GST. Όπως φαίνεται και στο κάτωθι σχήμα, το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει έπειτα από τον προαγωγέα και την αλληλουχία της GST, μια περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης γνωστή και ως 'multiple

cloning site', στην οποία μπορούν να δράσουν ένας μεγάλος αριθμός περιοριστικών ενδονουκλεασών προσφέροντας 3 πλαίσια ανάγνωσης. Ο μεγάλος αυτός αριθμός επιτρέπει την εισαγωγή σχεδόν οποιασδήποτε αλληλουχίας για την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης με το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης. Ανάμεσα από την αλληλουχία της GST και της επιθυμητής πρωτεΐνης σημειώνεται η αλληλουχία της θρομβίνης, η οποία υποδεικνύει το σημείο όπου η αντίστοιχη πρωτεάση μπορεί να δράσει, αποχωρίζοντας την επιθυμητή πρωτεΐνη από τη σήμανση GST. Η περιοχή του πλασμιδίου που αναφέρεται ως 'polylinker' κωδικοποιεί 5 κατάλοιπα γλυκίνης, τα οποία παρέχουν ευελιξία στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και επιτρέπουν τον αποχωρισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης από την GST, ενόσω η συντηγμένη πρωτεΐνη βρίσκεται δεσμευμένη πάνω στην κολώνα καθαρισμού.⁹⁴

Η μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης ανακόπτεται έπειτα από τη σύνδεση της λακτόζης στον tac προαγωγέα του οπερονίου. Η λακτόζη παράγεται από το γονίδιο lacI (το γονίδιο lacI^q αναφέρεται στην παραγωγή της πρωτεΐνης-καταστολέα σε μεγάλη ποσότητα) και δρα ως πρωτεΐνη-καταστολέας. Η επαγωγή της μεταγραφής επιτυγχάνεται με την προσθήκη του παράγοντα IPTG, μιας β-γαλακτοσιδάσης, η οποία ως ανάλογο της λακτόζης συνδέεται με την πρωτεΐνη-καταστολέα και με αυτόν τον τρόπο, αποτρέπει την κατασταλτική σύνδεση της λακτόζης με το DNA.⁹⁴

Τέλος, στο φορέα αυτό κλωνοποίησης υπάρχει και ένα γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Εκμεταλλεζόμενοι την ιδιότητα αυτή έναντι συγκεκριμένου αντιβιοτικού, είναι δυνατή η ανάπτυξη μόνο των βακτηριακών κυττάρων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο.⁹⁴



Εικόνα 14: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEX-KG με σημειωμένες τις σημαντικότερες περιοχές του πλασμιδίου⁹⁴

Επιλογή της βακτηριακής σειράς

Η σειρά βακτηριακών κυττάρων BL21cp επιτρέπει σε μεγάλο ποσοστό την αποτελεσματική έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών. Καθώς είναι γνωστό, το γονιδίωμα ορισμένων ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχει κωδικόνια τα οποία σπανίζουν στο γονιδίωμα των προκαρυωτικών οργανισμών. Αποτέλεσμα αυτού είναι κατά τη μετάφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών στα βακτηριακά κύτταρα, τα ελάχιστα διαθέσιμα tRNAs που αντιστοιχούν στις σπάνιες αυτές τριπλέτες να εξαντλούνται και η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών να ανακόπτεται. Τα tRNAs αυτά, λοιπόν, αν και βρίσκονται σε πληθώρα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς από τους οποίους προέρχονται οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, εντούτοις συχνά απουσιάζουν ή βρίσκονται σε μικρή αναλογία στα προκαρυωτικά κύτταρα όπου επιθυμούμε την παραγωγή των πρωτεϊνών. Προς αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, χρησιμοποιήθηκε η σειρά των βακτηριακών κυττάρων 'codon plus', η οποία περιέχει γονίδια, τα οποία παρέχουν επιπλέον αντίγραφα των σπάνιων αυτών tRNAs. Συνεπώς, τα κύτταρα της σειράς BL21cp DE3 φέρουν πλασμίδιο το οποίο κωδικοποιεί τα σπάνια αυτά tRNAs, προσφέροντας παράλληλα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Ακόμη, η σειρά διατηρεί ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά της σειράς BL21-Gold cells από την οποία προήλθε, όπως είναι η ανεπάρκεια Lon (σερίνης) και OmpT (ασπαρτικού) πρωτεασών, με σκοπό να διασφαλισθεί η ακεραιότητα των πρωτεϊνών, η ανεπάρκεια της DNA ενδονουκλεάσης endA 1, έτσι ώστε να μην αποικοδομηθεί το DNA από τη διαδικασία της miniprep, καθώς και ο φαινότυπος Hte (High transformation efficiency) για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.⁹⁵⁻⁹⁷

2.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ GST-h3MST ENZYMOY

Η ποιότητα και η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης στο σύστημα των βακτηριακών κυττάρων εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων που σχετίζονται με τις συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Οι σημαντικότεροι εξ'αυτών είναι η θερμοκρασία επώασης της υγρής καλλιέργειας, ο χρόνος επώασης, το θρεπτικό υλικό και η συγκέντρωση του παράγοντα IPTG. Ακολούθως αναλύονται ορισμένοι παράγοντες και επισημαίνονται οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή του ενζύμου GST-h3MST στην παρούσα μελέτη.

Σύμφωνα με προηγούμενη πρακτική του εργαστηρίου, αλλά και έπειτα από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας¹⁷, ο βέλτιστος χρόνος έκφρασης της πρωτεΐνης GST-h3MST παρατηρείται στις 18 ώρες επώασης στους 20°C, προσθέτοντας τον παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM στην καλλιέργεια.

Η συγκέντρωση του IPTG

Το IPTG είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται ως μιμητής της αλλολακτόζης. Η αλλολακτόζη είναι ένας μεταβολίτης της λακτόζης, ο οποίος συνδέεται με αυτή και έτσι, επιτρέπει τη μεταγραφή του αντίστοιχου οπερονίου. Σε πειράματα κλωνοποίησης, λοιπόν, το IPTG χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου μέσω σύνδεσης με τον καταστολέα του οπερονίου. Η αποτελεσματικότερη απελευθέρωση του υποκινητή και η επαγόμενη έκφραση παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις IPTG 1mM. Σε περιπτώσεις όπου η ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης αποτελεί αιτία κατακρήμνισης αυτής ή εμφάνισης τοξικότητας στα βακτηριακά κύτταρα, επιλέγονται μικρότερες συγκεντρώσεις, της τάξης 0,1-0,8mM.^{92,93}

Η θερμοκρασία

Οι υψηλές θερμοκρασίες επαγωγής (>32°C) ευνοούν την έκφραση της πρωτεΐνης. Σε περιπτώσεις εμφάνισης τοξικότητας στα κύτταρα ή κατακρήμνισης της πρωτεΐνης, η μείωση της θερμοκρασίας προτιμάται για την επαγωγή της έκφρασης σε ορισμένες περιπτώσεις.^{92,93} Η μείωση της θερμοκρασίας με στόχο η επιθυμητή πρωτεΐνη να παραμείνει εν διαλύσει, είναι επόμενο να προκαλέσει μείωση της ταχύτητας ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας, για αυτό και η βέλτιστη έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου παρατηρείται μετά από ολονύκτια επώαση.⁹²

Ο χρόνος επαγωγής κατά τον οποίο υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη-στόχος

Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου επιλέγεται να γίνει κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων, δηλαδή της απότομης αύξησης του αριθμού αυτών. Η εκθετική φάση ελέγχεται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) στα 600nm, η οποία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,8. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών συμβαίνει συνήθως κατά τις πρώτες ώρες της επαγωγής της έκφρασης και στη συνέχεια μειώνεται εκθετικά, καθώς τα κύτταρα περνούν στη φάση θανάτου. Η διάρκεια, όμως, της επαγωγής εξαρτάται και από τη θερμοκρασία στην οποία επώαζεται η καλλιέργεια, όπως αναφέρθηκε.^{92,93}

2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ENZYMOY GST-h3MST

2.4.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΑΡΧΟΝΤΟΣ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση του αποθέματος γλυκερόλης που υπήρχε ήδη στο εργαστήριο, προβήκαμε σε αλληπάλληλες καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Πιο

συγκεκριμένα, σε πλαστικό σωλήνα των 50 mL που περιέχει 2 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB, 2 uL αμπικιλίνη και 2 uL χλωραμφαινικόλη πραγματοποιείται εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με τα βακτηριακά κύτταρα. Η προκαλλιέργεια αυτή επωάζεται σε κλίβανο στους 37° C υπό ισχυρή ανάδευση στα 250rpm για 16-18 h. Σημειώνεται πως το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη απαιτείται με σκοπό τη διατήρηση του φαινοτύπου των βακτηριακών κυττάρων BL21 DE3 codon plus, ενώ το αντιβιοτικό αμπικιλίνη για τη διάκριση των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο με την επιθυμητή αλληλουχία του ενζύμου GST-h3MST. Μετά την παρέλευση των 16-18 ωρών κάνουμε επίστρωση σε τρυβλίο με τα απαραίτητα αντιβιοτικά, το οποίο και τοποθετούμε ανάποδα στον κλίβανο στους 37° C για 16-18 h. Στη συνέχεια, επιλέγουμε μια αποικία από το τρυβλίο και με αυτήν εμβολιάζουμε πλαστικό σωλήνα των 50mL με 5 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB και 5 uL από τα απαραίτητα αντιβιοτικά. Η προκαλλιέργεια αυτή επωάζεται εκ νέου σε κλίβανο στους 37° C υπό ισχυρή ανάδευση στα 250rpm για 16-18 h. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας (Optical Density, OD) στα 600nm. Σύμφωνα με την προσδιορισθείσα OD, υπολογίζουμε την απαιτούμενη αραιώση της καλλιέργειας, ώστε η νέα μέτρηση OD να κυμαίνεται περί τα 0,5. Φτιάχνουμε, λοιπόν, νέο πλαστικό σωλήνα των 50 mL με υγρό θρεπτικό υλικό LB μέχρι τελικού όγκου 5 mL (που έχει προηγουμένως ζεσταθεί στους 30° C), 5 uL από τα απαραίτητα αντιβιοτικά και την προκύπτουσα ποσότητα από την προηγούμενη καλλιέργεια, όπως αυτή δίνεται από το νόμο της αραιώσης.

$$V = \frac{0,5 \times 5 \text{ mL}}{OD}$$

Η προκαλλιέργεια αυτή επωάζεται σε κλίβανο στους 37° C υπό ισχυρή ανάδευση στα 250rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου στην τιμή 0,8, όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Μετά από αυτό το βήμα, φτιάχνουμε νέο απόθεμα γλυκερόλης, κατά το οποίο σε αποστειρωμένο cryovial προστίθενται 250 uL αποστειρωμένης γλυκερόλης 60% και 750 uL καλλιέργειας. Το cryovial τοποθετείται και φυλάσσεται στους -80° C.

2.4.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Σε πλαστικό σωλήνα των 50 mL που περιέχει 6 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB και 6 uL από τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη και αμπικιλίνη πραγματοποιείται εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα από το απόθεμα γλυκερόλης. Σημειώνεται πως η εν λόγω βακτηριακή σειρά απαιτεί το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη για τη διατήρηση του φαινοτύπου της, για να διασφαλιστεί, δηλαδή, η ύπαρξη του πλασμιδίου με τα

επιπλέον tRNAs. Το αντιβιοτικό αμικικιλίνη προστίθεται για να παραλάβουμε μόνο τους κλώνους που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με την αλληλουχία της πρωτεΐνης μας.⁹⁵⁻⁹⁷

Ετοιμάζονται τέσσερις προκαλλιέργειες όπως περιγράφηκε προηγουμένως και αυτές επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση στα 250rpm ολονυκτίως (12-16 h). Μετά την παρέλευση 16 ωρών επώασης των προκαλλιιεργειών, μετρούμε την οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) στα 600nm μιας προκαλλιέργειας με αραιώση 1:4, διότι αυτή αναμένεται υψηλή. Στη συνέχεια, κρατάμε 2 δείγματα των 500 uL ως το αρνητικό control (overnight) πριν την επαγωγή, τα οποία φυλάμε στους 4° C. Τα δείγματα αυτά αναμένεται να δείξουν τις πρωτεΐνες που εκφράζουν τα βακτηριακά μας κύτταρα. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 13000g για 2 λεπτά και κρατάται το ίζημα. Σημειώνεται πως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα που βρήκαμε στο προηγούμενο βήμα, θα υπολογίσουμε την ποσότητα Laemmli buffer που απαιτείται για τη λύση των κυττάρων από τα δείγματα, σύμφωνα με τον εξής κανόνα: 10 uL 1x Laemmli Buffer/ 0,1 OD στο 1 mL καλλιέργειας. Μετά την προσθήκη του 1x Laemmli Buffer, τα δείγματα ανακινώνται έντονα για αρκετή ώρα και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -20° C.

2.4.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Γνωρίζοντας το βέλτιστο χρόνο επώασης για την έκφραση του ενζύμου από προηγούμενη πρακτική του εργαστηρίου, αλλά και την υπάρχουσα βιβλιογραφία,¹⁷ αναπτύσσεται καλλιέργεια μεγαλύτερης κλίμακας.

Για την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας, σε κωνική φιάλη των 2 L προστίθενται 1 L υγρό θρεπτικό υλικό LB, 1 mL αμικικιλίνη και οι αντίστοιχες προκαλλιέργειες υπό άσηπτες συνθήκες. Σημειώνεται πως κατά την επαγωγή της έκφρασης, το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη μπορεί και να απουσιάζει, δεδομένου πως η επιλογή του κλώνου με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά έχει ήδη πραγματοποιηθεί.⁹⁵⁻⁹⁷ Η κωνική φιάλη τοποθετείται στον επωαστήρα στους 37° C υπό ανάδευση στα 200rpm για περίπου 2 ώρες, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να είναι ίση με 0,6-0,8. Όταν αυτή επιτευχθεί και εφόσον γνωρίζουμε τις ευνοϊκές συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης GST-h3MST, προχωρούμε σε προσθήκη του παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, με στόχο την επαγωγή της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας για 18 ώρες στους 20° C υπό ανάδευση στα 200rpm. Στο τέλος της επώασης, μετρείται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε αραιώση 1:4 και συλλέγονται δύο δείγματα

των 500 uL ως το θετικό control (επαγωγή), στα οποία ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως (βλ. §Ανάπτυξη προκαλλιέργειας).

Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 6000rpm για 20 λεπτά στους 4° C και έπειτα, απορρίπτεται αμέσως το υπερκείμενο υγρό. Τα ιζήματα τοποθετώνται στον πάγο και επαναδιαλύονται με 1x PBS με προσοχή χωρίς τη δημιουργία φυσαλίδων, έτσι ώστε να μην επέλθει αποδιάταξη της συντηγμένης πρωτεΐνης.⁹² Τα επαναδιαλυμένα ιζήματα μεταφέρονται σε προζυγισμένους πλαστικούς σωλήνες των 35 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση προς απομάκρυνση του διαλύματος στα 6000rpm για 20 λεπτά στους 4° C. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται αμέσως το υπερκείμενο υγρό και τα ιζήματα με σημειωμένο το καθαρό βάρος τους αποθηκεύονται στους -80° C μέχρι την απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου.

2.4.4. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ιζήματα που παραλήφθησαν μετά τις 18 ώρες καλλιέργειας αφήνονται να ξεπαγώσουν και τοποθετώνται στον πάγο. Σε αυτά προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 1x PBS, λαμβάνοντας υπόψη πως 1 gr ιζήματος απαιτεί 5-10 mL PBS. Σημειώνεται πως κατά τη διαδικασία αυτή επιθυμούνται χαμηλές θερμοκρασίες με στόχο να μειωθεί η πιθανότητα πρωτεόλυσης, για αυτό και τα διαλύματα είναι κρύα και χρησιμοποιείται πάγος.⁹² Ακολουθεί επαναδιάλυση με τη χρήση πιπέτας Pasteur, χωρίς την πρόκληση φυσαλίδων, έως ότου το μίγμα να είναι αρκετά υδαρές, καθώς και προσθήκη μείγματος αναστολέων πρωτεασών, αναλογικά με τον όγκο του επαναδιαλυμένου ιζήματος (1 ταμπλέτα αναστολέα πρωτεασών για κάθε 10mL επαναδιαλυμένου ιζήματος). Το επαναδιαλυμένο ίζημα μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα με κοίλο πάτο και σε αυτό προστίθεται μαγνητικό αναδευτηράκι. Ο γυάλινος σωλήνας τοποθετείται στην άκρη από ποτήρι ζέσεως γεμάτο με πάγο, ώστε να είναι ορατό. Το σύστημα τοποθετείται για ανάδευση για περίπου 20 λεπτά, ώστε να γίνει καλή επαναδιάλυση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το ποτήρι ζέσεως με το σύστημα μαγνητικής ανάδευσης μεταφέρεται στο μηχάνημα των υπερήχων με σκοπό τη λύση των κυττάρων. Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Η ακίδα τοποθετείται στο κέντρο του γυάλινου σωλήνα, σε ύψος τέτοιο έτσι ώστε να μην ακουμπά και εμποδίζει το μαγνητικό αναδευτηράκι που υπάρχει στη βάση του σωλήνα με το επαναδιαλυμένο ίζημα. Ρυθμίζεται το μηχάνημα των υπερήχων ώστε να δίνει τους υπερήχους με μια συχνότητα στο 0,5 κύκλο, 60 Amplitude. Ο χρόνος που απαιτείται για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων από καλλιέργεια 1L υπολογίζεται περί τα 40 λεπτά. Με το πέρας των υπερήχων, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 14000g για 30 λεπτά στους 4° C για την απομάκρυνση των

μεμβρανικών δομών, οι οποίες στο τέλος της φυγοκέντρωσης είναι διακριτές λόγω της χαρακτηριστικής εμφάνισης κατακόρυφης γραμμής στο ίζημα, γνωστής ως 'blue black'. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο πλαστικό σωλήνα και τοποθετείται στον πάγο. Από το υπερκείμενο αυτό, το οποίο ονομάζεται 'total extraction' μεταφέρονται 20 uL σε νέο πλαστικό σωλήνα και εκεί προστίθενται 20 uL 2x Laemmli Buffer.

2.4.5. SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)

Τα κυτταρικά δείγματα που συλλέχθηκαν -overnight και επαγωγή- τοποθετώνται από τους -20° C σε φελιζόλ και το φελιζόλ τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως με ζεστό νερό. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται στο μηχάνημα υπερήχων με την ακίδα να είναι βυθισμένη στο νερό. Το μηχάνημα δίνει υπερήχους σε μια σταθερή συχνότητα, έπειτα από ρύθμιση στο 0,5 κύκλο, 70 Amplitude για μισή ώρα. Μετά το τέλος των υπερήχων τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα δείγματα που συλλέχθηκαν -total extraction, overnight, επαγωγή- βράζονται στους 100° C για 4 min.

Στη συνέχεια, γίνεται ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Χάρη στο SDS που περιέχεται στο Laemmli buffer, οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινούνται παρουσία ηλεκτρικού πεδίου συναρτήσει του μοριακού τους βάρους.

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Διαμορφώνεται ειδική γυάλινη μήτρα διαστάσεων 9,5cm x 7,5cm x 0,1cm, μέσα στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων διαχωρισμού και φόρτωσης. Αρχικά, προστίθενται υπό γρήγορη ανάδευση τα συστατικά που απαρτίζουν το πήκτωμα διαχωρισμού και αυτό μεταφέρεται στη γυάλινη μήτρα. Η επιφάνειά του επικαλύπτεται με απεσταγμένο νερό, το οποίο μετά από 20-30 λεπτά απομακρύνεται. Στη συνέχεια, ετοιμάζεται το πήκτωμα φόρτωσης και μεταφέρεται στη γυάλινη μήτρα πάνω από την επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού. Ύστερα από περίπου 25 λεπτά, προστίθενται 20 uL από τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος φόρτωσης. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστών μοριακών μεγεθών (μάρτυρας-marker). Στο χώρο της συσκευής προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το τροφοδοτικό μηχάνημα ρυθμίζεται στα 30mA για μισή ώρα και μετά στα 60mA.

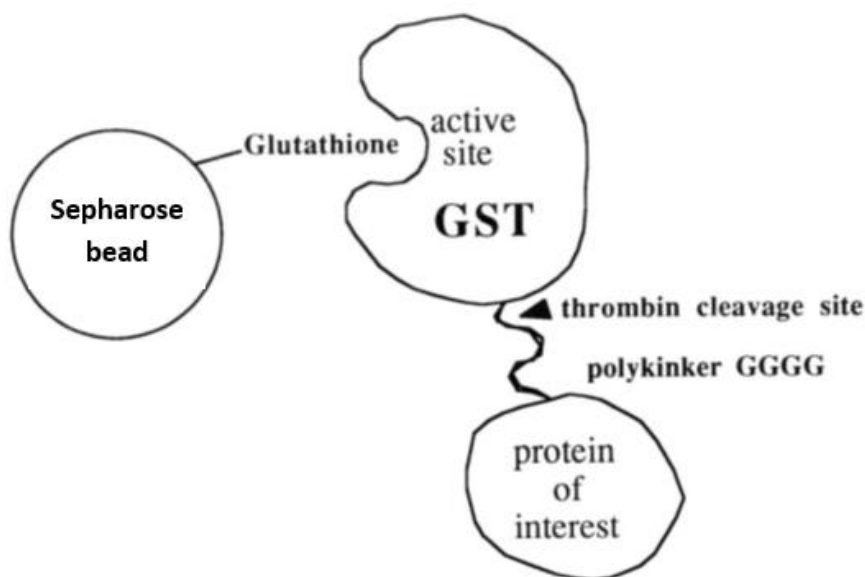
Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, αφαιρείται η πηκτή από τις γυάλινες πλάκες και τοποθετείται σε ένα πλαστικό δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρωματισμού της πηκτής, Coomassie Reagent, για μισή ώρα. Μόλις επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, αποχύνεται η χρωστική και προστίθεται επανειλημμένως το διάλυμα αποχρωματισμού της πηκτής. Όταν εμφανιστούν οι μπάντες, αποχύνεται το διάλυμα και φωτογραφίζεται η πηκτή, στην οποία είναι εμφανής η επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου μετά την προσθήκη του IPTG. Ένα ακόμη θετικό στοιχείο που αξίζει να παρατηρήσουμε είναι η έντονη παρουσία της πρωτεΐνης-στόχου στο total extraction, το οποίο υποδεικνύει την επαρκή διαλυτότητα αυτής στις συνθήκες όπου πραγματοποιήθηκε η έκφραση του ενζύμου.

2.4.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πιο αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού πρωτεϊνών. Η αρχή μεθόδου της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια των πρωτεϊνών για ορισμένες χημικές ομάδες, δηλαδή στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αναστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-προσδέτες. Ο προσδέτης αυτός ακινητοποιείται σε κατάλληλο πολυμερές υλικό που ονομάζεται φορέας και λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας. Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή, τότε τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον προσδέτη θα συγκρατηθεί στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με τον προσδέτη, με αποτέλεσμα τη διάσταση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.⁹⁸

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-h3MST γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας με κολώνες GSTrap FF, όπου χρησιμοποιείται ως δεσμευτής η γλουταθειόνη (Glutathione, GSH), η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με σεφαρόζη. Κατά την ανάπτυξη αυτής της χρωματογραφίας συγγένειας είναι σαφές πως χρησιμοποιήθηκε η ικανότητα της GST (Glutathione-S-Transferase) να συνδέεται με υψηλή συγγένεια και να χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη με σκοπό την αναγωγή, ξενοβιοτικών στη βάση τους, ουσιών. Η πρωτεΐνη-στόχος, όπως αναφέρθηκε, είναι συνεκφρασμένη με GST στο *N*-τελικό άκρο της και μπορεί έτσι να δεσμεύεται στη στήλη, ενώ άλλες προσμίξεις απομακρύνονται με έκπλυση με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Η παραλαβή της πρωτεΐνης-στόχου στο

συγκεκριμένο πείραμα έγινε με την προσθήκη στην κολώνα διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης, έτσι ώστε να απελευθερωθεί η προσδεδεμένη συντηγμένη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Συχνά ακολουθούνται και άλλα πρωτόκολλα όπου με την προσθήκη στην κολώνα διαλύματος θρομβίνης, επιτυγχάνεται η παραλαβή της επιθυμητής πρωτεΐνης, αποκομμένης από τη σήμανση GST.⁹⁴



Εικόνα 15: Η αρχή μεθόδου της χρωματογραφίας συγγένειας για την απομόνωση χιμαιρικής πρωτεΐνης⁹⁴

Αρχικά, περνάμε από τη στήλη μικρή ποσότητα NaCl 2M, συνήθως ίση με 2 φορές τον όγκο της στήλης, προς απομάκρυνση τυχόν πρωτεϊνών που έχουν συγκρατηθεί από προηγούμενη χρήση. Στη συνέχεια, από τη στήλη περνάμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε ποσότητα 5 φορές τον όγκο της στήλης, ώστε να επέλθει εξισορρόπηση από το προηγούμενο ισχυρό διάλυμα (equilibration). Ακολούθως, φορτώνεται το διάλυμα της πρωτεΐνης σε πολύ χαμηλή ταχύτητα ροής, έχοντας πρώτα συλλέξει δείγμα (50 uL) για την ανάλυση SDS-PAGE, το οποίο θα αντιπροσωπεύει το προϊόν της κυτταρολύσεως πριν τη στήλη (total extraction). Με το τέλος φόρτωσης του δείγματος, η χιμαιρική πρωτεΐνη αναμένεται να έχει δεσμευτεί στη στήλη και το υπόλοιπο κυτταρόλυμα εκλύεται. Αυτό είναι το δεύτερο κλάσμα από τη διαδικασία της απομόνωσης (κυτταρόλυμα μετά τη στήλη-flow through). Έπειτα, η στήλη εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε ποσότητα 5 φορές τον όγκο της στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις και συλλέγεται το διάλυμα που περνά τη στήλη ως καθαρισμός με PBS (wash after PBS). Στη συνέχεια, εισάγουμε το διάλυμα έκλυσης που περιέχει την ανηγμένη γλουταθειόνη και εκεί αναμένεται να εκλυσθεί η χιμαιρική πρωτεΐνη (εκλούμενη GST-h3MST πρωτεΐνη-eluted protein). Τονίζεται πως η εκλούμενη πρωτεΐνη μπορεί να παραληφθεί σε περισσότερα του ενός

κλάσματα, με στόχο να συνενωθούν στο τέλος -μετά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου- μόνο τα κλάσματα που έχουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης, ώστε να μην επέλθει αραίωση αυτής. Τέλος, από τη στήλη περνάμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε όγκο πενταπλάσιο της στήλης με στόχο έναν ήπιο καθαρισμό αυτής και συλλέγεται το έκλουσμα ως καθαρισμός μετά την έκλυση της πρωτεΐνης (wash after elution). Αξίζει να σημειωθεί, πως λαμβάνοντας υπόψιν τη σχετικά αργή κινητική σύνδεσης της GST με τη γλουταθειόνη, επιθυμείται η ελάχιστη ροή κατά τη διέλευση του δείγματος της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ικανότητα συγκράτησης της επιθυμητής πρωτεΐνης, η μέγιστη απόδοση της στήλης. Αντιθέτως, η ταχύτητα ροής κατά τη διέλευση των υπολοίπων διαλυμάτων, μπορεί να είναι η μέγιστη επιτρεπτή.⁹²

Τα δείγματα -total extraction, flow through, wash after PBS, eluted protein in fractions και wash after elution- αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) για την εξακρίβωση της επιτυχούς απομόνωσης. Λαμβάνονται από κάθε κλάσμα 20 uL -εκτός από το πρώτο κλάσμα 'total extraction' όπου έχουν ήδη ληφθεί 50 uL - και σε καθένα από αυτά προστίθεται ίσος όγκος 2x Laemmli Buffer. Ακολουθεί θέρμανση για 4 λεπτά στους 100°C, φυγοκέντρηση στα 15000rpm για 1 λεπτό και πραγματοποιείται η ανάλυση SDS-PAGE, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.5..

2.4.7. ΑΛΛΑΓΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Στη χημική GST-h3MST πρωτεΐνη γίνεται αλλαγή διαλύματος από το διάλυμα έκλυσης (διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης σε Tris HCl: GSH 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH=8) σε διάλυμα φωσφορικών SPB 20mM + DTT 1mM, pH=8,2, προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητά της. Παράλληλα, συμπυκνώνεται η πρωτεΐνη με βέλτιστη περιεκτικότητα 1-3 mg/mL, αφού οι πρωτεΐνες καλό είναι να αποθηκεύονται σε μεγάλη συγκέντρωση για να είναι περισσότερο σταθερές.⁹⁰

Η αλλαγή διαλύματος γίνεται με τη χρήση μεμβράνης 14kDa, η οποία επιτρέπει σε ενώσεις μοριακού βάρους κάτω των 14 kDa να διαπερνούν τη μεμβράνη. Συγκεκριμένα, το κάτω άκρο της κυλινδρικής μεμβράνης δένεται με κόμπο, ενώ από την πάνω οπή προσθέτουμε προσεκτικά το διάλυμα της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση που έχουμε χωρίσει το διάλυμα της πρωτεΐνης σε δύο διαλύματα ανάλογα με τη συγκέντρωσή της πρωτεΐνης, όπως αυτή φάνηκε από την ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, γεμίζουμε τη μεμβράνη με το ένα διάλυμα, αφήνουμε μικρό κενό χώρο, δένουμε κόμπο, πληρώνουμε τη μεμβράνη με το δεύτερο διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, αφήνουμε και πάλι μικρό κενό χώρο και

τέλος, δένουμε κόμπο και στο πάνω άκρο τη μεμβράνης για να μη διαφύγει η πρωτεΐνη. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο, τον οποίο έχουμε πληρώσει με το διάλυμα στο οποίο θέλουμε να είναι πλέον η πρωτεΐνη διαλυμένη, δηλαδή το SPB 20mM + DTT 1mM, pH=8,2. Η αναλογία του όγκου του δείγματος ως προς τον όγκο του διαλύματος στο οποίο τοποθετούμε τη μεμβράνη υποδηλώνει το βαθμό αραίωσης που θα υποστεί το αρχικό διάλυμα της πρωτεΐνης. Συνήθως επιλέγεται αραίωση 1/20, δηλαδή ο όγκος του διαλύματος στο οποίο θέλουμε να μεταφέρουμε την πρωτεΐνη να είναι 20 φορές τον όγκο του δείγματος. Το σύστημα τοποθετείται στους 4^ο C ολονυκτίως (16-18h) και σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο ώστε να μη στεγνώσει η μεμβράνη. Στη διάρκεια αυτή, η επιθυμητή πρωτεΐνη συγκρατείται μες στη μεμβράνη, ενώ πρωτεΐνες και ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους από τα 14kDa τη διαπερνούν και διαφεύγουν στο εξωτερικό διάλυμα. Με την πάροδο του χρόνου επέρχεται αραίωση του διαλύματος στο οποίο ήταν αρχικά διαλυμένη η πρωτεΐνη με το εξωτερικό διάλυμα, το οποίο βρίσκεται και σε μεγαλύτερη αναλογία.

Με το πέρας της διαδικασίας γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς αλβουμίνης (protein determination with BSA). Ακόμη, 10 uL από τα νέα διαλύματα της πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4.5., με στόχο να δούμε την καθαρότητα της πρωτεΐνης -δηλαδή, το είδος και την αναλογία των προσμίξεων που υπάρχουν στο τελικό διάλυμα σε σχέση με την επιθυμητή πρωτεΐνη.

Τέλος, η πρωτεΐνη αποθηκεύεται στους -80°C.

2.4.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

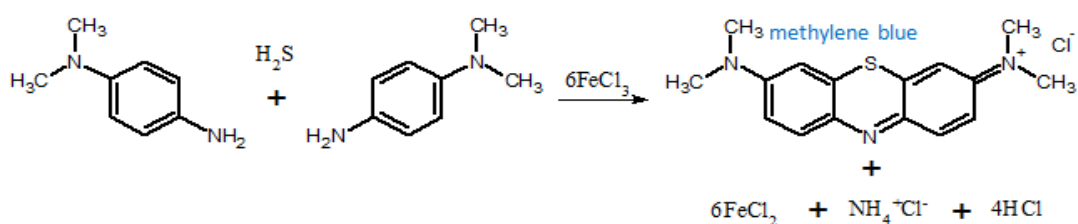
Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε προσδιορίζεται με το ολοκληρωμένο σύστημα "DC Protein assay kit", το οποίο υπολογίζει τη συγκέντρωση των δειγμάτων με βάση την απορρόφησή τους στα 750nm, χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης (BSA).

2.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ENZYMOY GST-h3MST (METHYLENE BLUE ASSAY)

2.5.1. METHYLENE BLUE ASSAY

Αρχικά, για τον έλεγχο της δραστηριότητας του χιμαιρικού ενζύμου GST-h3MST, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του εργαστηρίου που εφαρμόζονταν για τον έλεγχο

της δραστηριότητας των δύο άλλων ενζύμων παραγωγής υδροθείου -CBS, CSE- με ορισμένες αλλαγές. Το πρωτόκολλο αυτό αφορούσε στον προσδιορισμό του παραγόμενου H_2S με μια τεχνική ονόματι Methylene Blue Assay. Η τεχνική αυτή αποτελεί μια χρωματομετρική αναλυτική μέθοδο, που στηρίζεται στην αντίδραση του παραχθέντος H_2S με το αντιδραστήριο N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνη (DPD) και καταλύτη τον τριχλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$). Το κυανούν του μεθυλενίου που προκύπτει παρουσιάζει απορρόφηση στα 655nm, χάρη στην οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του H_2S , βάσει μιας πρότυπης καμπύλης ενός δότη σουλφιδίου (Na_2S).



Εικόνα 16: Αντίδραση προσδιορισμού H_2S με τη μέθοδο Methylene Blue

Ο προσδιορισμός Methylene Blue Assay εισήχθη το 1883 από τον Fischer και έκτοτε χρησιμοποιείται σε αναλύσεις ρουτίνας σε δείγματα προς ανίχνευση του υδροθείου. Ωστόσο, λόγω της πτητικότητας του μορίου αυτού και της εύκολης οξειδωσής του, η μέθοδος παρουσιάζει προβλήματα, για αυτό και απαιτώνται ορισμένες τροποποιήσεις και βελτιστοποιήσεις για τη λήψη αξιόπιστων και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων.^{19,99} Έπειτα από σύγκριση των διάφορων πρωτοκόλλων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, προβήκαμε σε μικρές, αλλά ουσιαστικές αλλαγές του πρωτοκόλλου του εργαστηρίου, οι οποίες αναφέρονται ακολούθως.

Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε υποδείκνυε για τη σύνθεση του H_2S την προσθήκη στο απομονωμένο ένζυμο του υποστρώματος αυτού (3-μερκαπτοπυροσταφυλικό), καθώς και του κατάλληλου διαλύματος φωσφορικών για την επίτευξη του επιθυμητού pH=8,2, όπως αυτό αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες.¹⁷ Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 100 uL. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται στον πάγο με την εξής σειρά: διάλυμα φωσφορικών, ένζυμο και υπόστρωμα. Παράλληλα, ως αρνητικό control για τον προσδιορισμό προετοιμάζεται και πείραμα μάρτυρα (“vehicle”), όπου προστίθενται όλα τα ανωτέρω αντιδραστήρια πλην του υποστρώματος. Τα δείγματα τοποθετώνται για επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.¹⁰¹ Το πείραμα μάρτυρας αφαιρείται από το αντίστοιχο κανονικό πείραμα.

Η καμπύλη αναφοράς ετοιμάζεται χρησιμοποιώντας Na_2S αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα φωσφορικών, ώστε να προκύψουν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0/ 15,625/

31,25/ 62,5/ 125/ 250 uM. Αξίζει να σημειωθεί πως αν και το κυανούν του μεθυλενίου παρουσιάζει υψηλή μοριακή απορροφητικότητα, εντούτοις η ευαισθησία της μεθόδου είναι περιορισμένη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υδροθείου.¹⁹ Επίσης, παρατηρούνται αποκλίσεις από το νόμο των Lambert-Beer σε υδατικά διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων υδροθείου, λόγω του σχηματισμού διμερών και τριμερών του έγχρωμου προϊόντος.^{19,99,102-104} Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις επελέγησαν οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις της καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη στη συνέχεια θα αναλυθεί ταυτόχρονα με τα δείγματα.

Όταν ολοκληρωθεί η επώαση των δειγμάτων, τοποθετώνται στον πάγο για 15 λεπτά και ακολουθεί η προσθήκη των αντιδραστηρίων τόσο στα δείγματα (πilotικά και κανονικά), όσο και στην καμπύλη αναφοράς. Η τοποθέτηση στον πάγο προς μείωση της θερμοκρασίας αποτελεί μία αλλαγή στο πρωτόκολλο του εργαστηρίου, που έγινε με στόχο την αποτροπή της διαφυγής του αερίου υδροθείου, προτού αντιδράσει για την παραγωγή χρώματος.^{42,104} Αρχικά, προστίθενται προσεκτικά και γρήγορα 200 uL ZnAc 1%, ώστε να δεσμευτεί το H₂S που έχει παραχθεί και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια, προστίθενται χωρίς ανάδευση 200 uL TCA 20%. Το τριγλωροξικό οξύ συντελεί στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών ανεξάρτητα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών, με ένα μηχανισμό που δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος μέχρι και σήμερα. Πιθανολογείται πως η κατακρήμνιση επέρχεται λόγω απομάκρυνσης μορίων νερού γύρω από την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη υδρόφοβων περιοχών και τη συσσωμάτωση αυτών. Στο αποτέλεσμα αυτό συμβάλλει και το φορτίο του οξέως λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη. Εκτεταμένες μελέτες υποδεικνύουν ως βέλτιστες συγκεντρώσεις για την επίτευξη του ανωτέρου αποτελέσματος, τις 5-45% TCA, για αυτό και το αρχικό πρωτόκολλο τροποποιήθηκε.^{101,105,106} Έπειτα, προστίθενται 100 uL N,N-dimethyl-p-Phenylenediamine sulphate (DPD) 20mM διαλυμένο σε HCl 7,2 M και γίνεται ισχυρή ανάδευση.⁴⁴ Το όξινο pH επιτρέπει την απελευθέρωση του δεσμευμένου υδροθείου, έτσι ώστε αυτό να αντιδράσει παράγοντας το κυανούν του μεθυλενίου.¹⁰¹ Τονίζεται πως δεν ευνοείται θερμοδυναμικώς η αντίδραση του παραγόμενου υδροθείου με τις σουλφυδρυλικές ομάδες της πρωτεΐνης ή των προστιθέμενων αντιδραστηρίων, οπότε και δεν αναμένονται απώλειες στη μέτρηση της ακριβούς συγκέντρωσης του αερίου.^{10,22} Τέλος, προστίθενται 100 uL FeCl₃ 30 mM διαλυμένο σε HCl 1,2 M.⁴⁴ Σημειώνεται πως τα δύο τελευταία αντιδραστήρια –DPD, FeCl₃ – παρασκευάζονται φρέσκα εξαιτίας της ευαισθησίας αυτών στο φως και την οξείδωση. Ακόμη, οι συγκεντρώσεις και η αναλογία των δύο αντιδραστηρίων, υπεύθυνων για την παραγωγή του χρώματος επελέγησαν σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, όπου ερευνηθήκε η βέλτιστη αναλογία αυτών σε σχέση με το εύρος συγκεντρώσεων υδροθείου που αναμένεται από το δείγμα.⁹⁹ Επίσης, όπως αναφέρθηκε, λαμβάνοντας

υπόψιν το pKa του πρώτου ιονισμού του υδροθείου συμπεραίνουμε πως στο εξαιρετικά όξινο pH μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων, το υδρόθειο βρίσκεται στη μη ιονισμένη του μορφή, για αυτό και είναι ιδιαίτερα σταθερό αλλά και πτητικό. Η πτητικότητα αυτή ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα στον αντικειμενικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραχθέντος υδροθείου και άρα την ευαισθησία της μεθόδου, για αυτό και συνιστάται η προσθήκη των αντιδραστηρίων να γίνεται ταχέως ή δυνατόν αυτά να προστίθενται ταυτοχρόνως.^{9,99}

Τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά στο σκότος, ώστε να γίνει ο σχηματισμός του κυανού του μεθυλενίου.^{99,101,104} Το εξαιρετικά όξινο pH συμβάλλει στη δημιουργία του χρώματος.⁹⁹ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000g για 3 λεπτά με στόχο την καταβύθιση της πρωτεΐνης και την παραλαβή του υπερκείμενου στη μέτρηση.^{42,44} Για τη μέτρηση, 200 uL των δειγμάτων και της καμπύλης αναφοράς τοποθετώνται σε μικροπλάκα 96 κελιών και υπολογίζεται η απορρόφησή τους στα 655nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου.⁹⁹ Σημειώνεται πως οι ανωτέρω όγκοι των αντιδραστηρίων αφορούν σε διπλέςτες.

2.5.2. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στο αρχικό πρωτόκολλο του εργαστηρίου με τις αλλαγές που αναλύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες για να προκύψουν 2 τεχνικές επαναλήψεις:

10/100 ug από το ένζυμο, final C= 0,8/8 μM

5/10 uL 3-MP 1mM σε SPB 20mM, final C= 25/50 μM

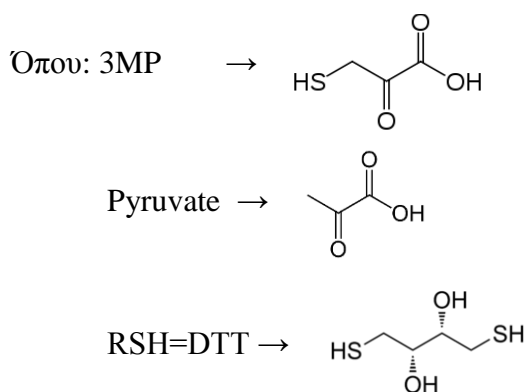
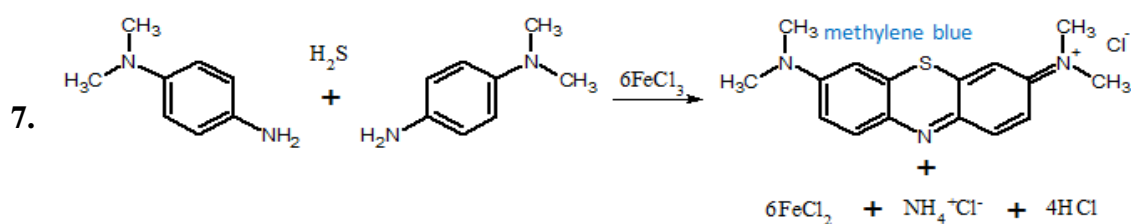
q.s. 200 uL διάλυμα φωσφορικών NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 20mM, pH=8,2

Το πρωτόκολλο αυτό μας οδήγησε σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα: στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 10 ug ενζύμου, το παραγόμενο υδρόθειο ήταν ελάχιστο και μάλιστα ανεξάρτητο της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Εν αντιθέσει, όταν χρησιμοποιήθηκαν 100 ug ενζύμου, το ένζυμο φαίνονταν δραστικό με αυξανόμενη παραγωγή υδροθείου, αναλογικά με την αύξηση του υποστρώματος.

Το αποτέλεσμα αυτό ώθησε σε ενδελεχή έρευνα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με την εν λόγω μέθοδο προσδιορισμού και το μηχανισμό δράσης του ενζύμου, έρευνα που οδήγησε στο συμπέρασμα πως είναι απαραίτητη η ύπαρξη σημαντικής συγκέντρωσης αναγωγικού για να επιτευχθεί η αντίδραση παραγωγής υδροθείου από το ένζυμο 3MST. Η ύπαρξη αναγωγικού δικαιολογεί το ανωτέρω αποτέλεσμα, δεδομένου πως η δεκαπλάσια ποσότητα ενζύμου συνεπάγεται και δεκαπλάσια συγκέντρωση του αναγωγικού DTT (dithiothreitol), αφού το ένζυμο είναι αποθηκευμένο σε SPB 20mM + DTT 1mM.

Συνοπτικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα:

1. $3\text{-MST-Cys-SH} + 3\text{-MP} \rightarrow 3\text{-MST-Cys-S-SH} + \text{pyruvate}$
2. $3\text{-MST-Cys-S-SH} + \text{RSH} \rightarrow 3\text{-MST-Cys-SH} + \text{RSSH}$
3. $\text{RSSH} + \text{RSH} \rightarrow \text{RSSR} + \text{H}_2\text{S}$
4. $\text{H}_2\text{S} + (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \rightarrow \text{ZnS} + 2\text{CH}_3\text{COOH}$
5. $3\text{-MST-Cys-SH} + \text{CCl}_3\text{COOH (TCA)} \rightarrow 3\text{-MST-Cys-SH} \downarrow$
6. $\text{ZnS} + 2\text{HCl} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{ZnCl}_2$



Εικόνα 17: Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ενζυμική αντίδραση και τη μέθοδο προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας

2.5.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Όπως αναλύεται εκτενώς στην παράγραφο 1.3.3. της εισαγωγής, πλήθος μελετών έχουν υποστηρίξει τον απαραίτητο ρόλο του αναγωγικού παράγοντα στην ενζυμική αντίδραση του 3MST κατά την παραγωγή H_2S , βάσει του μηχανισμού δράσης του ενζύμου. Αν και τα πειράματα που περιγράφονται στις εν λόγω μελέτες κλίνουν ως προς τη διθειοθρεϊτόλη ως τον πλέον χρησιμοποιούμενο αναγωγικό παράγοντα, εντούτοις, οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις από το συγκεκριμένο αναγωγικό παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις (0,1mM – 20 mM DTT).^{17,32,36,38,40-44} Οι αποκλίσεις αυτές βεβαίως δικαιολογούνται από τις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης του αέριου διαβιβαστή ή τις διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν στην ίδια αναλυτική μέθοδο, καθιστούν, όμως, δυσκολότερο το έργο μας στην επιλογή της

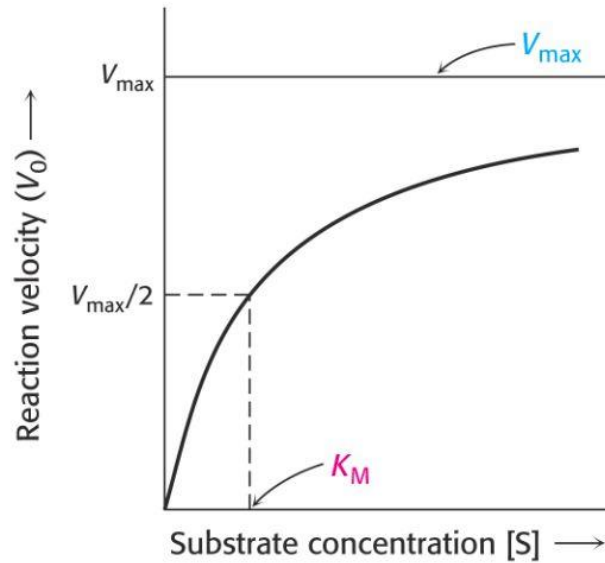
ιδανικής συγκέντρωσης για το πείραμά μας. Ως εκ τούτου, τα επόμενα πειράματα προσανατολίστηκαν στην εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αναγωγικού, ώστε η μέθοδος προσδιορισμού να καταστεί αξιόπιστη. Σημειώνεται πως, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν ευνοείται θερμοδυναμικώς η αντίδραση του παραγόμενου υδροθείου με τις σουλφυδρυλικές ομάδες της πρωτεΐνης ή των προστιθέμενων αντιδραστηρίων, όπως είναι η διθειοθρεϊτόλη, για αυτό και το αναγωγικό μέσο δεν αναμένεται να επηρεάσει αρνητικά την αναλυτική μέθοδο τοιουτοτρόπως.^{10,22}

Οι συγκεντρώσεις αναγωγικού που ελέγχθησαν πρώτα ήταν η εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση 20mM DTT, καθώς και η συγκέντρωση 1mM. Η σύγκριση της καμπύλης αναφοράς με την υψηλή συγκέντρωση αναγωγικού σε σχέση με αυτήν απουσία DTT και η αντίστοιχη σύγκριση των μαρτύρων (vehicles), μας οδήγησε στην απόρριψη της υψηλής συγκέντρωσης αναγωγικού. Αντίθετα, η χρήση αναγωγικού σε συγκέντρωση 1mM φάνηκε να επιδρά θετικά στην ενζυμική αντίδραση, χωρίς να επηρεάζει το μάρτυρα (vehicle) ή την καμπύλη αναφοράς, σε σχέση με το διάλυμα χωρίς αναγωγικό. Προς εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αναγωγικού, ελέγχθησαν επίσης οι συγκεντρώσεις 0,1mM και 5mM DTT, οι οποίες όμως δεν έδωσαν αντίστοιχα καλά αποτελέσματα με τη συγκέντρωση αναγωγικού 1mM. Αυτός είναι και ο λόγος που εν τέλει επελέγη το διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM για τον έλεγχο της δραστηριότητας του χιμαιρικού ενζύμου GST-h3MST και τη διερεύνηση της κινητικής αυτού.

2.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η ενζυμική κινητική αποτελεί ένα μεγάλο και ιδιαίτερα σημαντικό κεφάλαιο της ενζυμολογίας, το οποίο ασχολείται επισταμένως με τους παράγοντες που επηρεάζουν την κατάλυση των διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων. Οι σημαντικότεροι εξ'αυτών είναι η συγκέντρωση των αντιδρώντων (ένζυμο, υπόστρωμα, αναστολείς κλπ), το pH, η ιονική ισχύς και φυσικά, η θερμοκρασία. Η μελέτη και κατανόηση καθενός από τους ανωτέρω παράγοντες στη συμβολή τους επί της ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να αποκαλύψει ενδιαφέροντα στοιχεία, όπως την ταυτότητα των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο.¹⁰⁷

Αναλύοντας τον παράγοντα του υποστρώματος, όταν η συγκέντρωση του ενζύμου είναι σταθερή και η μεταβολή της ταχύτητας της αντίδρασης μελετάται συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος, λαμβάνεται μια καμπύλη, ορθογώνια υπερβολή, η οποία παρουσιάζεται στο κάτωθι διάγραμμα.¹⁰⁷



Εικόνα 18: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η μεταβολή της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.¹⁰⁷

Η ευθεία αναλογία μεταξύ της ταχύτητας της αντίδρασης και της συγκέντρωσης του υποστρώματος είναι γνωστή με τον όρο ‘κινητική πρώτης τάξης’. Σε υψηλότερες τιμές υποστρώματος, η αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης με κάθε προσθήκη υποστρώματος σταδιακά μειώνεται και καθίσταται ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στο σημείο αυτό η αντίδραση προοδεύει με μέγιστη ταχύτητα και ο ρυθμός αύξησης της ταχύτητας μηδενίζεται, οπότε η κινητική γίνεται ‘μηδενικής τάξης’.¹⁰⁰ Οι λόγοι που το σύστημα φτάνει σε μία μέγιστη ταχύτητα, η οποία στο διάγραμμα V-[3MP] παρουσιάζεται ως πλατώ, είναι ποικίλλοι. Χαρακτηριστικά αναφέρονται πως ο βαθμός κορεσμού του ενζύμου από το υπόστρωμα μειώνεται πιθανώς λόγω μείωσης της συγκέντρωσης του υποστρώματος συναρτήσει του βαθμού προόδου της αντίδρασης, η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης ενδέχεται να γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των προϊόντων ή ακόμα το ίδιο το προϊόν μπορεί να δρα ως αναστολέας του ενζύμου.¹⁰⁸

Τονίζεται πως η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης που υπακούει στις γνωστές εξισώσεις Michaelis-Menten αφορά στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης, πριν το παραγόμενο προϊόν αυξηθεί σημαντικά. Στο στάδιο αυτό, όλοι οι λόγοι που αναφέρθηκαν δεν έχουν τη χρονική δυνατότητα να παρέμβουν και έτσι οι συνθήκες στη μέτρηση της αρχικής ταχύτητας είναι απόλυτα γνωστές.^{107,109} Με τον όρο ‘ταχύτητα’ της ενζυμικής αντίδρασης αναφερόμαστε στην ταχύτητα με την οποία παράγεται το προϊόν στη μονάδα του χρόνου συναρτήσει της ποσότητας του ενζύμου, για αυτό και οι μονάδες είναι $\mu\text{mol προϊόντος}/\text{min αντίδρασης}/\mu\text{g ενζύμου}$.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Εικόνα 19: Η εξίσωση της ταχύτητας της ενζύμικης αντίδρασης κατά Michaelis-Menten

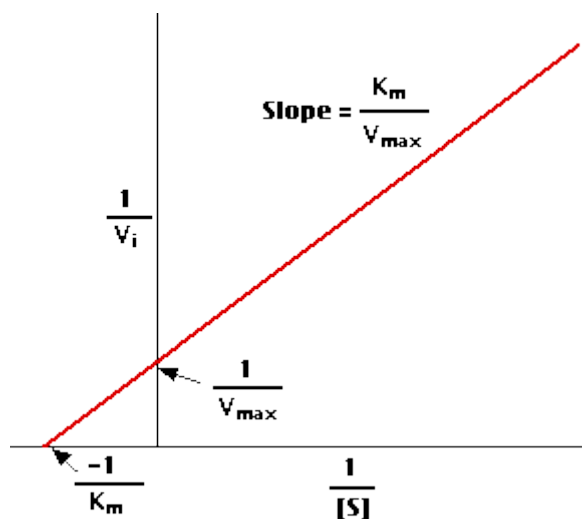
Ο προσδιορισμός των σταθερών Michaelis-Menten και ιδιαίτερα της K_m , παρουσιάζει ενδιαφέρον για πολλούς λόγους. Αρχικά, η σταθερά αυτή αποτελεί μέτρο της συγγένειας του υποστρώματος για το ένζυμο, μιας και υψηλή K_m δείχνει την ανάγκη ύπαρξης μεγάλης συγκέντρωσης υποστρώματος, ώστε να επιτευχθεί ταχύτητα αντίδρασης ίση με τη μισή της μέγιστης και άρα, υποδηλώνει μικρή συγγένεια. Το θεωρούμενο ‘καλύτερο υπόστρωμα’ θα είναι αυτό με την καλύτερη αναλογία V_{\max}/K_m . Επίσης, η σταθερά αυτή μπορεί να αποτελέσει δείκτη της συγκέντρωσης του υποστρώματος στους οργανισμούς που φέρουν το εν λόγω ένζυμο, καθώς και να προβλέψει την ταχύτητα της αντίδρασης *in vivo*. Εάν, για παράδειγμα, η συγκέντρωση του υποστρώματος ενδοκυτταρικά βρεθεί πολύ μικρότερη από την τιμή της K_m , αυτό συνεπάγεται τη μικρή ταχύτητα της αντίδρασης και τη σημαντική επιρροή του υποστρώματος στον καθορισμό της ταχύτητας. Επιπλέον, η μεταβολή στην τιμή των σταθερών Michaelis-Menten μπορεί να αποκαλύψει τη συμπεριφορά ορισμένων ουσιών ως αναστολείς ή ενεργοποιητές των μελετούμενων ενζύμων και ακόμα, να χαρακτηρίσει τον τύπο αυτής της αναστολής.¹⁰⁷

Δεδομένου του τύπου του διαγράμματος της ενζυμικής κινητικής (εικόνα 18), καθίσταται σαφές πως είναι ιδιαίτερα δύσκολος ο υπολογισμός των σταθερών Michaelis-Menten από την ορθογώνια υπερβολή που σχηματίζεται. Με στόχο τη διευκόλυνση των υπολογισμών, οι Lineweaver-Burk μετασχημάτισαν τους άξονες στα αντίστροφα αυτών.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Εικόνα 20: Η εξίσωση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης κατά Lineweaver-Burk

Έτσι, προέκυψε ευθεία γραμμή που τέμνει και τους δύο άξονες, με τα σημεία τομής να υποδεικνύουν τις τιμές των δύο σταθερών.¹⁰⁷



Εικόνα 21: Διάγραμμα Lineweaver-Burk όπου παρουσιάζεται το αντίστροφο της ενζυμικής ταχύτητας συναρτήσει του αντιστρόφου της συγκέντρωσης υποστρώματος¹⁰⁷

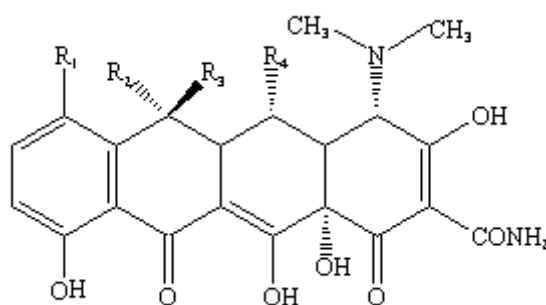
Για τη διερεύνηση της κινητικής του ενζύμου επαναλάβαμε 4 φορές προς εύρεση του μέσου όρου, πείραμα με 5 ug ενζύμου/100 uL αντίδρασης και αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος σε διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν κατάλληλα προς εύρεση των σταθερών K_m και v_{\max} με τη βοήθεια της εξίσωσης Lineweaver-Burk, από τις τομές της ευθείας με τους άξονες.

2.7. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Χάρη σε κεκτημένη γνώση του εργαστηρίου που προήλθε από πείραμα διαλογής υψηλής απόδοσης ή ‘high throughput screening’ όπως είναι ευρέως γνωστό, θελήσαμε να ελένξουμε με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο προσδιορισμού ‘methylene blue’ τις τετρακυκλίνες ως αναστολείς του ενζύμου 3MST.

Οι τετρακυκλίνες απομονώθηκαν αρχικά από ένα είδος ακτινομήκυτα, το *Streptomyces aureofaciens*, είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση απαραίτητων για το βακτήριο πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, δεσμεύονται στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος των μικροβίων, αποτρέποντας έτσι τη σύνδεση του t-RNA επί της υπομονάδας και άρα, την εισαγωγή νέων αμινοξέων στη νεοσυντιθέμενη πεπτιδική αλυσίδα.¹²¹

Ο γενικός τύπος των τετρακυκλινών αφορά στο σκελετό του οκταϋδروναφθακενίου.

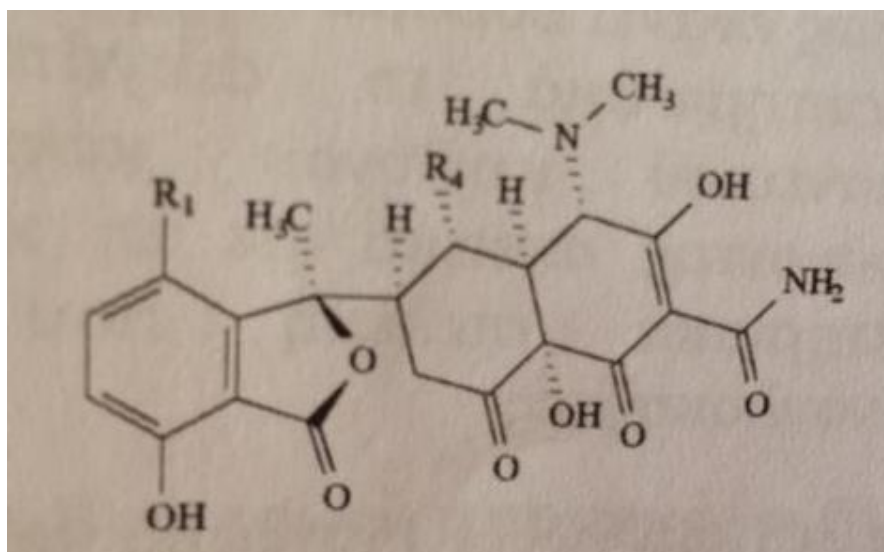


Εικόνα 22: Γενική δομή τετρακυκλινών¹²¹

Απαραίτητο δομικό στοιχείο αποτελεί η 4α-διμεθυλαμινομαδα με τη συγκεκριμένη διευθέτηση, που προκαλεί αλλοίωση της δομής των ριβοσωμάτων. Ωστόσο, η παρουσία ενολικών μορφών στο μόριο καθιστά δυνατή την επιμερίωση της ομάδας αυτής και οδηγεί στο ανενεργό 4-επιμερές της τετρακυκλίνης, όπου η διμεθυλαμινομαδα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το σύστημα των δακτυλίων και όχι κάτω από αυτό.¹²¹ Αυτός είναι και ο σημαντικότερος ίσως λόγος που συνιστάται τα διαλύματα των τετρακυκλινών να παρασκευάζονται φρέσκα, ώστε να διατηρούν σε υψηλό βαθμό τη δραστηριότητά τους.

Ακόμη, ένα δεύτερο πρόβλημα που αφορά στη χημική σταθερότητα των μορίων αυτών και αξίζει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι η υδρόλυση των τετρακυκλινών που φέρουν 6-υδροξυλομάδα προς ανενεργή λακτόνη, παρουσία βάσης.¹²¹ Δεδομένου πως τα πειράματα λαμβάνουν χώρα κάτω από ήπια αλκαλικό περιβάλλον (pH=8,2), το πρόβλημα αυτό φαίνεται να μην επηρεάζει τα

αποτελέσματά μας. Παρ'όλ'αυτά, καθίσταται σαφές πως τα διαλύματα των τετρακυκλινών πρέπει να παρασκευάζονται φρέσκα.



Εικόνα 23: Λακτονικό παράγωγο

Επίσης, λόγω της εκτεταμένης συζυγίας του μορίου των τετρακυκλινών, η ταυτομερής δομή έχει υψηλή τάση δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με πολυσθενή μέταλλα (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), τα οποία είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτα σε ουδέτερες τιμές pH.¹²¹ Σημειώνεται πως κατά την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος στο σχεδιασμό των πειραμάτων δε χρησιμοποιούνται διαλύματα με τα ανωτέρω πολυσθενή μέταλλα.

Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τετρακυκλίνες που ελέγχθησαν ως πιθανοί αναστολείς του ενζύμου 3MST.

| ΚΟΙΝΟΧΡΗΣΤΟ ΟΝΟΜΑ | R1 | R2 | R3 | R4 |
|----------------------|----------------------------------|----|-----------------|----|
| TETRACYCLINE | H | OH | CH ₃ | H |
| CHLORTETRACYCLINE | Cl | OH | CH ₃ | H |
| OXYTETRACYCLINE | H | OH | CH ₃ | OH |
| DEMECLOCYCLINE | Cl | OH | H | H |
| DOXYCYCLINE | H | H | CH ₃ | OH |
| MINOCYCLINE | N(CH ₃) ₂ | H | H | H |

Πίνακας 1: Συγκεντρωτική παρουσίαση των ομάδων των τεσσάρων πλευρικών αλυσίδων από τα μόρια των τετρακυκλινών που ελέγχθησαν ως αναστολείς του 3MST ενζύμου

2.7.1. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST

Σε πρώτο βήμα, δοκιμάσαμε 6 μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιώντας διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM, pH=8,2, 5 ug από το ένζυμο/100 uL αντίδρασης και το υπόστρωμα σε συγκέντρωση 100 uM. Στο πρώτο αυτό πείραμα, οι τετρακυκλίνες δε φάνηκαν ως αναστολείς, αποτέλεσμα μη αναμενόμενο σε σχέση με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας. Για την εξήγηση αυτού του ευρύματος, οι υποψίες στράφηκαν στο αναγωγικό DTT. Όντως, στο επόμενο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση του αναγωγικού, αποκαλύφθηκε η ανασταλτική δράση τεσσάρων μορίων. Επόμενος στόχος, λοιπόν, ήταν η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αναγωγικού, έτσι ώστε να μην καλύπτεται η ανασταλτική δράση των μορίων, ενώ παράλληλα να επιτρέπεται η χρήση της εν λόγω μεθόδου προσδιορισμού ως αξιόπιστης.

Έχοντας, τέλος, ορίσει τις νέες συνθήκες του πειράματος (5 ug ενζύμου/ 100 uL αντίδρασης, 100 uM υποστρώματος, Cf DTT=300 uM), ελέγξαμε εκ νέου τις τετρακυκλίνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αξιολογήσαμε το ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται συναρτήσει των συνθηκών του πειράματος.

2.7.2. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Με στόχο να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η ανασταλτική δράση ορισμένων τετρακυκλινών να οφείλεται σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού, λόγω παραδείγματος χάριν της αντίδρασης των τετρακυκλινών με το μόριο του υδροθείου και τη συνεπακόλουθη μείωση του σήματος, προχωρήσαμε στο εξής πείραμα: ετοιμάσαμε όπως έχει περιγραφεί μία καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις δότη σουλφιδίου και σε αυτή προσθέσαμε πολύ υψηλή συγκέντρωση (700 uM) μίας τετρακυκλίνης. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως οι τετρακυκλίνες δεν επηρεάζουν την απορρόφηση που δίνει το μόριο του υδροθείου και άρα, η μείωση του σήματος που παρατηρούσαμε στα προηγούμενα πειράματα είναι αποτέλεσμα πραγματικής αναστολής του ενζύμου.

2.7.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DTT ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Θέλοντας να ερμηνεύσουμε το γεγονός πως το πρώτο πείραμα με την αυξημένη συγκέντρωση αναγωγικού (DTT 1mM) απέκρυπτε την ανασταλτική δράση των τετρακυκλινών, σχεδιάσαμε πείραμα όπου μελετούσαμε την ανασταλτική δράση μιας

συγκεκριμένης συγκέντρωσης τετρακυκλίνης υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αναγωγικού. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, πως αυξανόμενη της συγκέντρωσης του αναγωγικού, το ποσοστό αναστολής του ενζύμου από το εκάστοτε μόριο τετρακυκλίνης μειώνονταν ή και μηδενίζονταν. Το εύρημα αυτό ίσως υποδηλώνει το μηχανισμό με τον οποίο τα μόρια των τετρακυκλινών ασκούν την ανασταλτική τους δράση επί του ενζύμου. Υποθέτουμε πως η τετρακυκλίνη 'κλειδώνει' το ένζυμο στη δομή περσουλφιδίου της κυστεΐνης 248 του ενεργού κέντρου, στο πρώτο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης και δεν επιτρέπει στο αναγωγικό να συνδεθεί σε δεύτερο χρόνο με το ένζυμο, απελευθερώνοντας το υδρόθειο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του αναγωγικού φαίνεται να ξεπερνά την ανασταλτική δράση των τετρακυκλινών, για αυτό και σε εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση αναγωγικού, η δραστηριότητα του ενζύμου δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη των συγκεκριμένων αναστολέων. Ο πιθανός μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης των τετρακυκλινών συμφωνεί με αυτόν που περιγράφηκε στην εισαγωγή, για τους αναστολείς του ενζύμου 3MST που περιγράφηκαν προσφάτως.³⁸

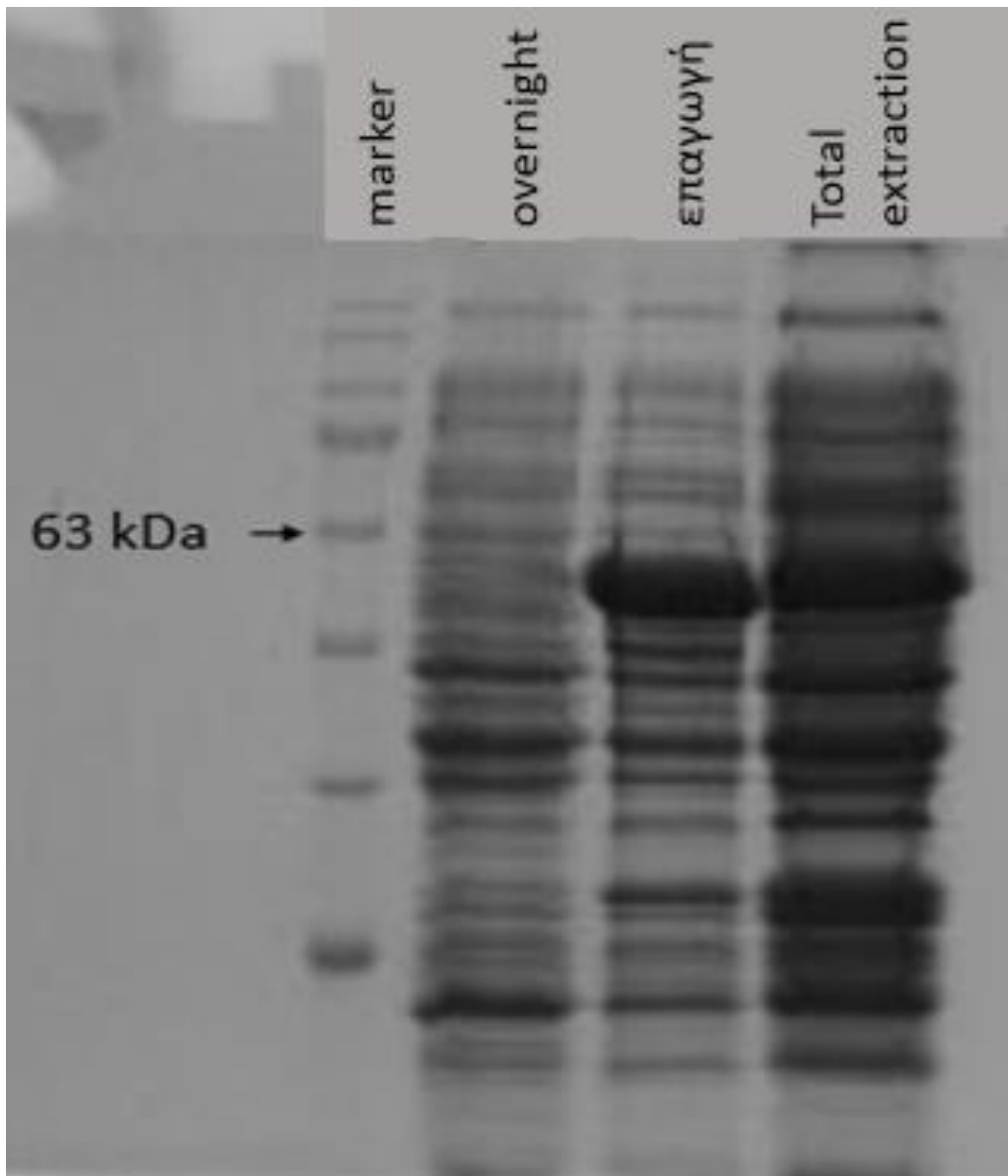
ΕΝΟΤΗΤΑ 3η :
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST

3.1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ 3MST ΕΝΖΥΜΟΥ

Μετά την ολονύκτια επώαση των προκαλλιιεργειών, κρατείται δείγμα ως αρνητικό control (overnight), πριν την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης μας. Κατά την ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας, γίνεται προσθήκη στην καλλιέργεια του παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και έπειτα από επώαση στους 20° C για 18 ώρες, κρατείται δείγμα ως θετικό control (επαγωγή). Μετά την επώαση στις συνθήκες που αναφέρθησαν, ακολουθεί φυγοκέντρωση της καλλιέργειας και παραλαβή του ιζήματος. Τα ιζήματα επαναδιαλύονται με 1x PBS, φυγοκεντρώνται εκ νέου και προχωρούμε σε λύση των βακτηριακών κυττάρων από τα νέα ιζήματα. Με το πέρας των υπερήχων, το διάλυμα φυγοκεντρείται με σκοπό την απομάκρυνση των μεμβρανικών δομών και φυλάσσεται το υπερκείμενο σε νέο πλαστικό σωλήνα στον πάγο. Από το υπερκείμενο αυτό, το οποίο ονομάζεται ‘total extraction’, κρατείται επίσης δείγμα.

Τα τρία αυτά δείγματα -overnight, επαγωγή, total extraction- μαζί με το μάρτυρα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Όπως φαίνεται στην εικόνα 24, η μπάντα στα 60kDa που αφορά στο ανασυνδυασμένο ένζυμο GST-h3MST, παρουσιάζεται πιο έντονη στο δείγμα επαγωγή από ο,τι στο overnight, γεγονός επιθυμητό, που δικαιολογείται από την προσθήκη του παράγοντα IPTG. Ακόμη, η μπάντα αυτή είναι επίσης έντονη στο δείγμα total extraction, το οποίο αποδεικνύει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης-στόχου στις συνθήκες καλλιέργειας. Από την ηλεκτροφόρηση αυτή, λοιπόν, διαπιστώσαμε την επιτυχημένη επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, καθώς και την επαρκή διαλυτότητα αυτής στις συνθήκες όπου πραγματοποιήθηκε η έκφραση του ενζύμου.

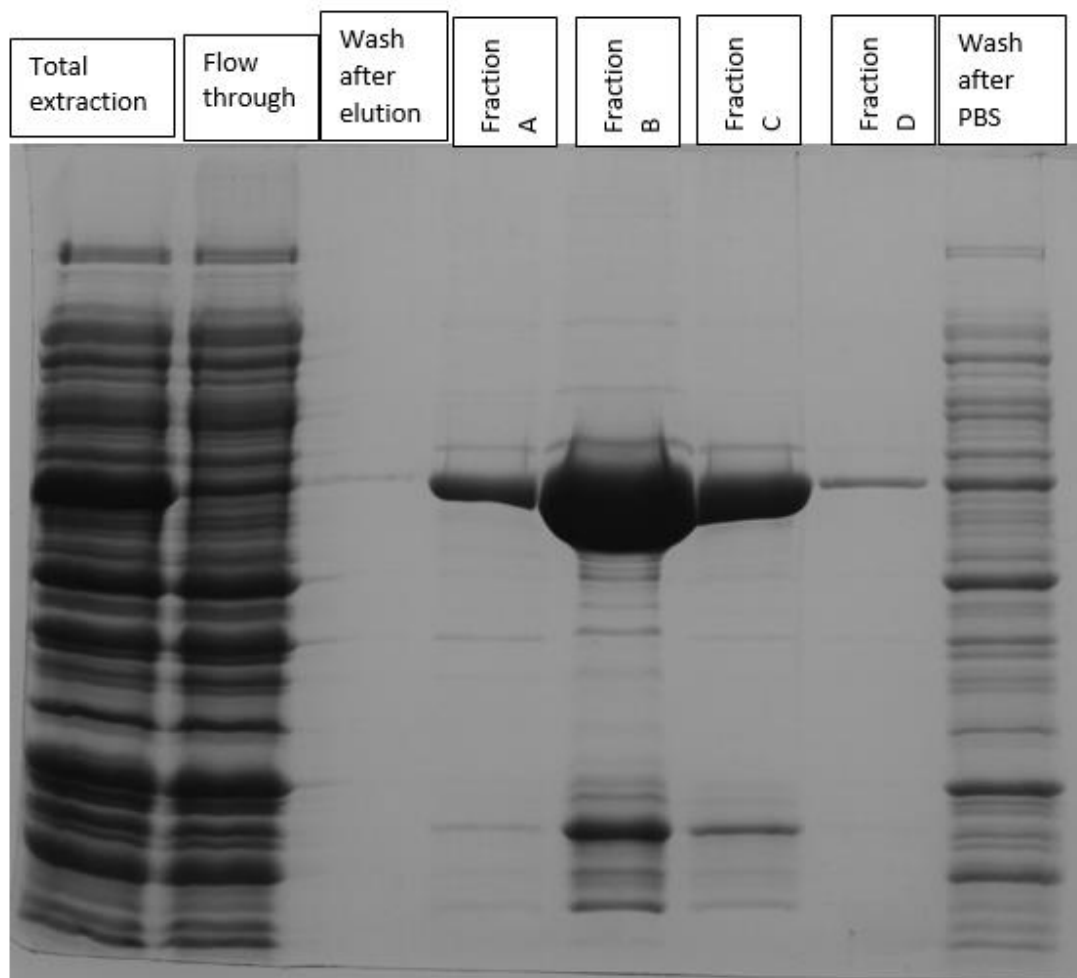


Εικόνα 24: SDS-PAGE μετά την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου GST-h3MST

3.1.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Μετά την απομόνωση του ενζύμου GST-h3MST από τη μεγάλη καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας, τα δείγματα που ελήφθησαν κατά τον καθαρισμό αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) για την εξακρίβωση της επιτυχούς απομόνωσης (εικόνα 25). Ως ‘total extraction’ αναφέρεται το προϊόν της κυτταρολύσεως πριν τη στήλη, ενώ ως ‘flow through’, το κυτταρόλυμα μετά τη στήλη. Η στήλη, έπειτα από το διάλυμα της πρωτεΐνης, εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις και συλλέγεται το έκλουσμα ως ‘καθαρισμός με

PBS' (wash after PBS). Στη συνέχεια, από τη στήλη διέρχεται το διάλυμα έκλουσης που περιέχει την ανηγμένη γλουταθειόνη και εκεί αναμένεται να εκλουσθεί η GST-χμιαρική πρωτεΐνη (εκλουόμενη GST-h3MST πρωτεΐνη). Σημειώνεται πως η εκλουόμενη πρωτεΐνη παραλαμβάνεται σε περισσότερα του ενός κλάσματα (fractions A,B,C,D). Τέλος, από τη στήλη περνάμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS με στόχο έναν ήπιο καθαρισμό αυτής και συλλέγεται το έκλουσμα ως 'καθαρισμός μετά την έκλουση της πρωτεΐνης' (wash after elution).

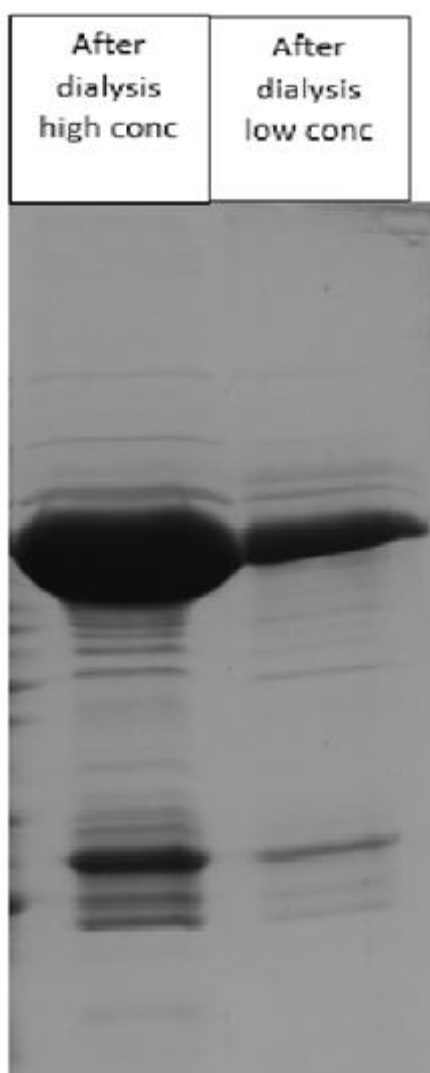


Εικόνα 25: SDS-PAGE όπου απεικονίζονται τα κλάσματα που ελήφθησαν από τη GSTrapFF στήλη. Τα 'fractions A-D' περιέχουν το ένζυμο GST-h3MST σε διάλυμα έκλουσης.

Τα κλάσματα που αναφέρονται ως 'fractions A,B,C,D' περιέχουν το ένζυμο GST-h3MST σε διάλυμα έκλουσης. Λόγω της εξαιρετικά μικρής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο τέταρτο κλάσμα -όπως φαίνεται από την ισχνή μπάνα στα 60kDa (εικόνα 25)- επελέχθησαν μόνο τα τρία πρώτα κλάσματα, ενώ το τέταρτο απερρίφθη για να μην επέλθει αραίωση της πρωτεΐνης μας. Τα κλάσματα A,C συνενώθηκαν ως το διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, ενώ το διάλυμα B ως το διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης.

3.1.3. ΑΛΛΑΓΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Στη χμαιορική GST-h3MST πρωτεΐνη γίνεται αλλαγή διαλύματος από το διάλυμα έκλουσης (διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης με Tris HCl: GSH 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH=8) σε διάλυμα φωσφορικών SPB 20mM + DTT 1mM pH=8,2, προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητά της. Παράλληλα, επέρχεται συμπύκνωση της πρωτεΐνης, γεγονός που επίσης ενισχύει τη σταθερότητα αυτής.⁹⁰ Μετά την αλλαγή διαλύματος με τη χρήση μεμβράνης 14kDa, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10 uL από τα δύο διαλύματα πρωτεΐνης –υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης-, με στόχο να δούμε την καθαρότητα αυτών (εικόνα 26). Αν και τα δύο διαλύματα φαίνεται να φέρουν προσμίξεις από άλλες πρωτεΐνες κυρίως μικρότερου μοριακού βάρους, εντούτοις η αναλογία της επιθυμητής πρωτεΐνης ως προς τις προσμίξεις –όπως φαίνεται από τη σύγκριση του πάχους των ζωνών- είναι ιδιαίτερα μεγάλη.



Εικόνα 26: SDS-PAGE μετά την αλλαγή διαλύματος της πρωτεΐνης από το διάλυμα έκλουσης σε διάλυμα φωσφορικών

3.1.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η συγκέντρωση του απομονωμένου ενζύμου προσδιορίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς αλβουμίνης. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού είναι τα ακόλουθα:

Διάλυμα πρωτεΐνης υψηλής συγκέντρωσης (high conc): 3,59 mg/mL

Διάλυμα πρωτεΐνης χαμηλής συγκέντρωσης (low conc): 1,67 mg/mL

3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ENZYMOY GST-h3MST (METHYLENE BLUE ASSAY)

Για τον έλεγχο της δραστηριότητας του χιμαιρικού ενζύμου GST-h3MST χρησιμοποιήθηκε η τεχνική 'Methylene Blue Assay'. Η τεχνική αυτή αποτελεί μια χρωματομετρική αναλυτική μέθοδο, που στηρίζεται στην αντίδραση του παραχθέντος H_2S με το αντιδραστήριο N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνη (DPD) και καταλύτη τον τριχλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$). Το κυανούν του μεθυλενίου που προκύπτει παρουσιάζει απορρόφηση στα 655nm, χάρη στην οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του H_2S , βάσει μιας πρότυπης καμπύλης ενός δότη σουλφιδίου (Na_2S).

Σημειώνεται πως τα κάτωθι πειράματα έγιναν από την ίδια παρτίδα ενζύμου, αυτής με την υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης. Ακόμη, τα πειράματα επαναλήφθησαν τουλάχιστον δύο φορές με τουλάχιστον 2 τεχνικές επαναλήψεις και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά γραφήματα αυτών.

3.2.1. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

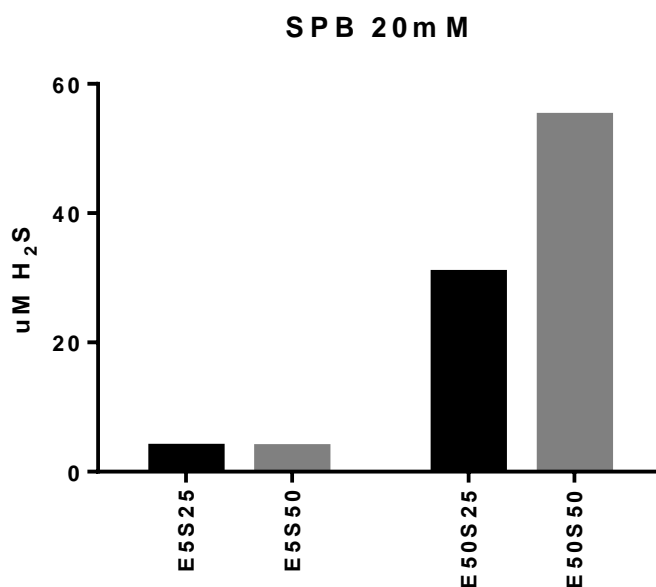
Ύστερα από την επιτυχή απομόνωση του ενζύμου, ελέγχθηκε η δραστηριότητα αυτού με την τεχνική Methylene Blue Assay, βάσει του πρωτοκόλλου που εφαρμόζονταν στο εργαστήριο για τα δύο άλλα ένζυμα παραγωγής υδροθείου, το CBS και το CSE. Στο πρωτόκολλο αυτό, ύστερα από μερικές αλλαγές που αναλύθηκαν εκτενώς στο ειδικό μέρος, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες:

10/100 ug από το ένζυμο, final C= 0,8/8 μ M

5/10 uL 3-MP 1mM σε SPB 20mM, final C= 25/50 μ M

q.s. 200 uL διάλυμα φωσφορικών NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 20mM, pH=8,2

Σημειώνεται πως στα επόμενα διαγράμματα θα συμβολίζεται το ένζυμο με το γράμμα 'E' και δίπλα από αυτό θα αναγράφεται η ποσότητα ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση 100 μ L. Το υποστρώμα θα συμβολίζεται με 'S' και δίπλα από αυτό θα αναγράφεται η συγκέντρωσή του στην ενζυμική αντίδραση.



Εικόνα 27: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης (μ M H_2S) στις συνθήκες 5 μ g και 50 μ g ενζύμου/100 μ L αντίδρασης παρουσία 25 και 50 μ M υποστρώματος

Πριν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αξίζει να σημειωθεί ότι το ένζυμο είναι αποθηκευμένο σε SPB 20mM + DTT 1mM και δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε το ίδιο απόθεμα ενζύμου στο πείραμα, στις ενζυμικές αντιδράσεις όπου η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 8 μ M, η συγκέντρωση του DTT είναι δεκαπλάσια από ότι σε αυτές όπου η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 0,8 μ M.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 27, στα 0,8 μ M (5 μ g /100 μ L) ενζύμου, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του υποστρώματος (από 25 σε 50 μ M), το παραγόμενο υδρόθειο από την ενζυμική αντίδραση θεωρείται αμελητέας ποσότητας και ανεξάρτητο της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ενζύμου από 0,8 σε 8 μ M (50 μ g /100 μ L), παρουσιάζεται αύξηση του παραγόμενου υδροθείου ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την συγκέντρωση 8 μ M ως την κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου για τις δεδομένες συγκεντρώσεις υποστρώματος έναντι αυτής των 0,8 μ M. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου η συγκέντρωση των 0,8 μ M ενζύμου παρουσία των ίδιων

συγκεντρώσεων υποστρώματος παρήγαγε μεγαλύτερες ποσότητες υδροθείου. Επιπλέον, η περίπτωση το ενζύμο που έχουμε παράξει να είναι ανενεργό αποκλείεται από το γεγονός ότι η δεκαπλάσια συγκέντρωση ενζύμου παράγει σχετικά υψηλές ποσότητες του αέριου διαβιβαστή.

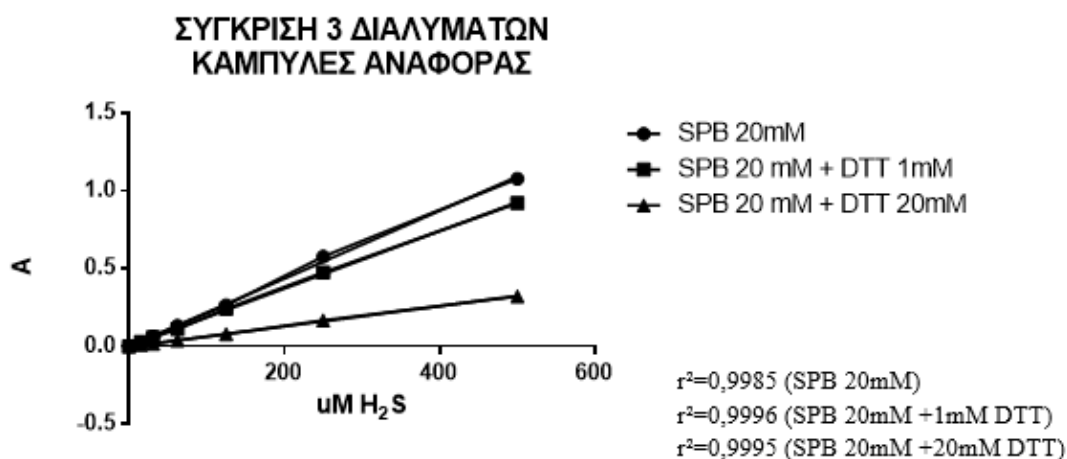
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση του αναγωγικού DTT είναι δεκαπλάσια στην περίπτωση όπου το ένζυμο έχει συγκέντρωση 8 uM από αυτή των 0,8 uM. Επομένως, το ενδιαφέρον μας στράφηκε στην παρουσία του αναγωγικού, η οποία, υστερα από ενδελεχή έρευνα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, αποδείχθηκε απαραίτητη για να επιτευχθεί η αντίδραση παραγωγής υδροθείου από το ένζυμο 3MST. Συνεπώς, η αμελητέα ποσότητα υδροθείου που παράγεται από το ένζυμο συγκέντρωσης 0,8 uM πιθανόν να μην οφείλεται στο ότι η ποσότητα του ενζύμου είναι ανεπαρκής, αλλά στην απουσία επαρκούς ποσότητας αναγωγικού. Για να μελετήσουμε την υπόθεση αυτή, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων DTT, διατηρώντας τη συγκέντρωση του ενζύμου στα 0,8 uM, όπως παρουσιάζεται στα πειράματα που ακολουθούν.

3.2.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τη μέθοδο προσδιορισμού methylene blue και το ένζυμο 3MST, όπως αναλύθηκαν εκτενώς στις παραγράφους 1.3.3. και 2.5.3., μας ώθησε στην προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης αναγωγικού παράγοντα στην ενζυμική αντίδραση. Ως εκ τούτου, τα επόμενα πειράματα προσανατολίστηκαν στην εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης DTT, ώστε η μέθοδος προσδιορισμού να καταστεί αξιόπιστη. Οι συγκεντρώσεις αναγωγικού που ελέγχθησαν πρώτα ήταν η εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση 20mM DTT, καθώς και η συγκέντρωση 1mM.

Όπως φαίνεται από τη σύγκριση των δύο καμπυλών αναφοράς (εικόνα 28) -χωρίς αναγωγικό και με υψηλή συγκέντρωση αναγωγικού (20mM)-, η καμπύλη αναφοράς με την υψηλή συγκέντρωση παρουσίαζε μειωμένη απορρόφηση σε σχέση με αυτή χωρίς αναγωγικό. Η ίδια, λοιπόν, συγκέντρωση υδροθείου έδινε μειωμένη απορρόφηση, πράγμα οπτικά αισθητό από την ένταση του χρώματος του προκύπτοντος κυανού του μεθυλενίου. Η διαφορά αυτή στο χρώμα και την απορρόφηση αποδόθηκε στην υψηλή συγκέντρωση του αναγωγικού, συγκέντρωση πολύ υψηλότερη από αυτή του καταλύτη (FeCl_3) της αντίδρασης παραγωγής χρώματος, η οποία είναι αντίδραση αναγωγής. Η υπόθεσή μας πως η διθειοθρεϊτόλη (DTT) ανάγει μέρος του FeCl_3 μη επιτρέποντας σε αυτόν να λειτουργήσει ως καταλύτης στην αντίδραση παραγωγής χρώματος (εικόνα 16) επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία.^{122,123}

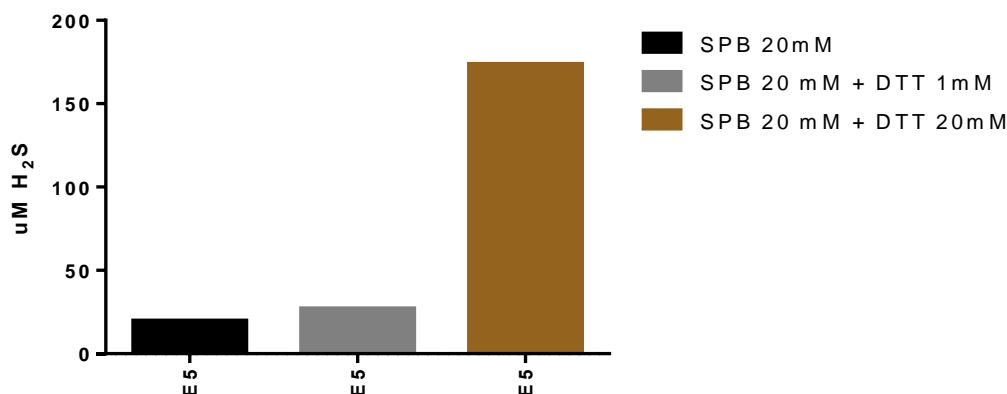
Όσον αφορά στη σύγκριση της καμπύλης αναφοράς χωρίς αναγωγικό σε σχέση με αυτή που είχε συγκέντρωση 1mM DTT (εικόνα 28), συμπεραίνουμε πως οι αντίστοιχες απορροφήσεις είναι αρκετά κοντά και δεν υπάρχει ουσιαστική επίδραση στην παραγωγή χρώματος.



Εικόνα28: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων δότη σουλφιδίου (καμπύλη αναφοράς) σε τρία διαλύματα, απουσία και παρουσία αναγωγικού (DTT)

Εκτός των καμπυλών αναφοράς, η υψηλή συγκέντρωση αναγωγικού είχε επίπτωση και στο μάρτυρα (vehicle), αφού το ένζυμο χωρίς την προσθήκη του υποστρώματος έδινε εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση υδροθείου (εικόνα 29). Αντίθετα, στις δύο άλλες περιπτώσεις όπου το αναγωγικό ήταν σε μικρότερη συγκέντρωση, οι συγκεντρώσεις του αερίου διαβιβαστή που απελευθερώνονταν από το ένζυμο απουσία υποστρώματος ήταν αμελητέες.

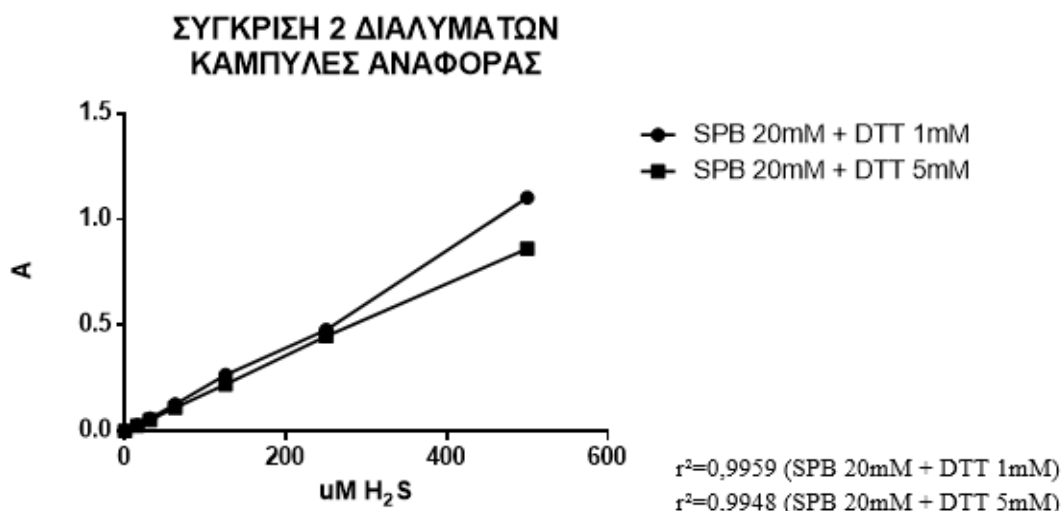
ΣΥΓΚΡΙΣΗ 3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (VEHICLES)



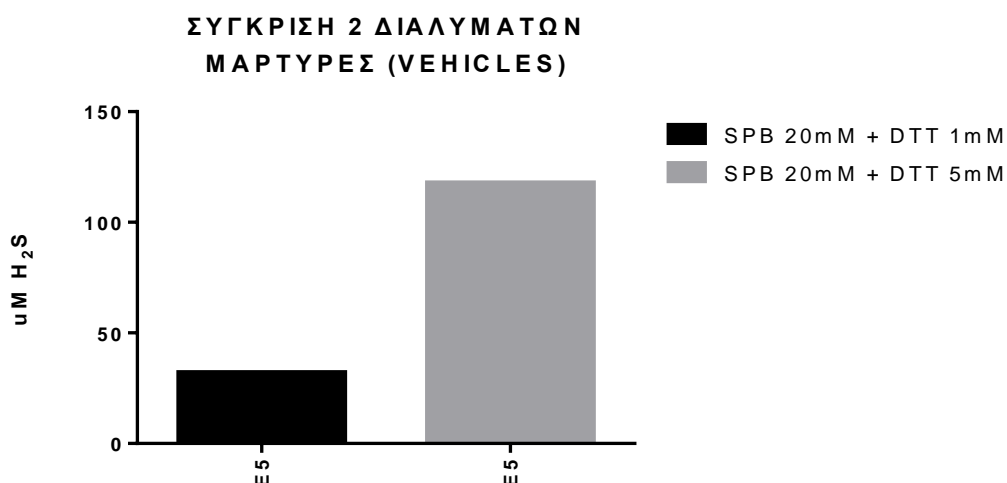
Εικόνα 29: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση του υδροθείου που απελευθερώνεται από το αρνητικό control (5 ug ενζύμου/100 uL αντίδρασης) σε τρία διαλύματα, απουσία και παρουσία αναγωγικού (DTT)

Η ερμηνεία του αποτελέσματος που δώσαμε στηρίχτηκε σε δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου αναφέρεται πως οι εξαιρετικά όξινες συνθήκες αυτής της μεθόδου προσδιορισμού, σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση της διθειόλης ως αναγωγικό ενδέχεται να οδηγήσουν σε απελευθέρωση υδροθείου και από άλλες πηγές πέραν της ενζυμικής αντίδρασης και άρα, σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.^{3,10,19,44} Λόγω της επίπτωσης της υψηλής συγκέντρωσης αναγωγικού στην καμπύλη αναφοράς και το αρνητικό control, λοιπόν, απορρίψαμε τη συγκέντρωση αυτή.

Προς εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αναγωγικού, ελέγχθηκε επίσης η συγκέντρωση 5mM DTT, η οποία απερρίφθη για τους ίδιους λόγους με τη συγκέντρωση 20mM DTT. Τα αντίστοιχα διαγράμματα (εικόνες 30 και 31) παρουσιάζονται κάτωθι.

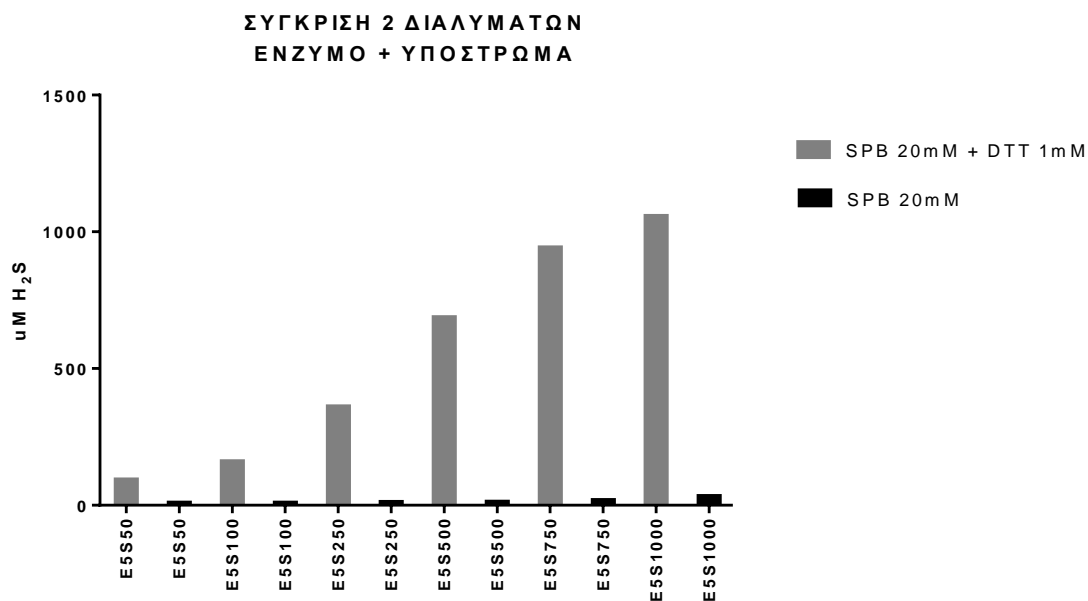


Εικόνα 30: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων δότη σουλφιδίου (καμπύλη αναφοράς) σε δύο διαλύματα, απουσία και παρουσία αναγωγικού (DTT)



Εικόνα 31: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση του υδροθείου που απελευθερώνεται από το αρνητικό control (5 μg ενζύμου/100 μL αντίδρασης) σε δύο διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού (DTT)

Σε επόμενο βήμα, το διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM το οποίο δεν επηρέαζε ούτε την καμπύλη αναφοράς ούτε το μάρτυρα, ελέγχθηκε ως προς τη συμβολή του στην αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος σε σύγκριση με το αντίστοιχο διάλυμα απουσία αναγωγικού. Η σύγκριση αυτή επιβεβαίωσε την αναγκαιότητα ύπαρξης αναγωγικού για την ενζυμική αντίδραση (εικόνα 32).

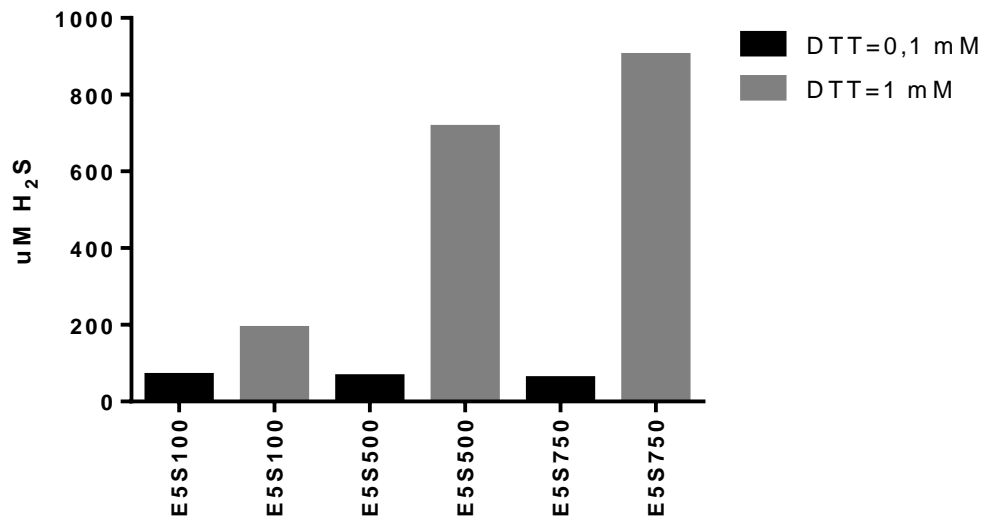


Εικόνα 32: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση του παραγόμενου υδροθείου από την ενζυμική αντίδραση (5 μ g ενζύμου/100 μ L αντίδρασης) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υποστρώματος σε δύο διαλύματα, απουσία και παρουσία αναγωγικού (DTT)

Επομένως, το συγκεκριμένο διάλυμα SPB 20mM+DTT 1mM φάνηκε να βοηθά την ενζυμική αντίδραση, χωρίς να επηρεάζει το μάρτυρα (vehicle) ή την καμπύλη αναφοράς, σε σχέση με το διάλυμα χωρίς αναγωγικό.

Σε επόμενο στάδιο ελέγχθηκε η μικρότερη συγκέντρωση αναγωγικού που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (0,1mM DTT) (εικόνα 33), η οποία όμως δε φάνηκε να είναι αρκετή για να επιτευχθεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος, όπως στην περίπτωση της συγκέντρωσης 1mM DTT.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ 2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΕΝΖΥΜΟ + ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ



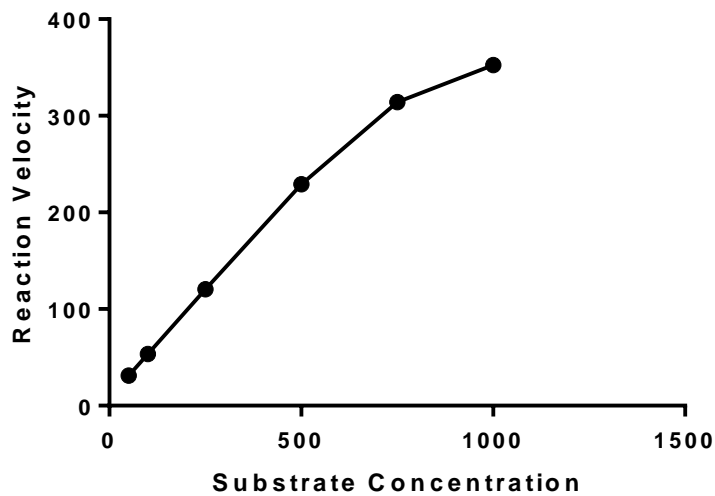
Εικόνα 33: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης ($\mu\text{M H}_2\text{S}$) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υποστρώματος, σε δύο διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού (DTT)

Αυτός είναι και ο λόγος που εν τέλει επελέγη το διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM για τον έλεγχο της δραστηριότητας του χιμαιρικού ενζύμου GST-h3MST και τη διερεύνηση της κινητικής αυτού.

3.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ

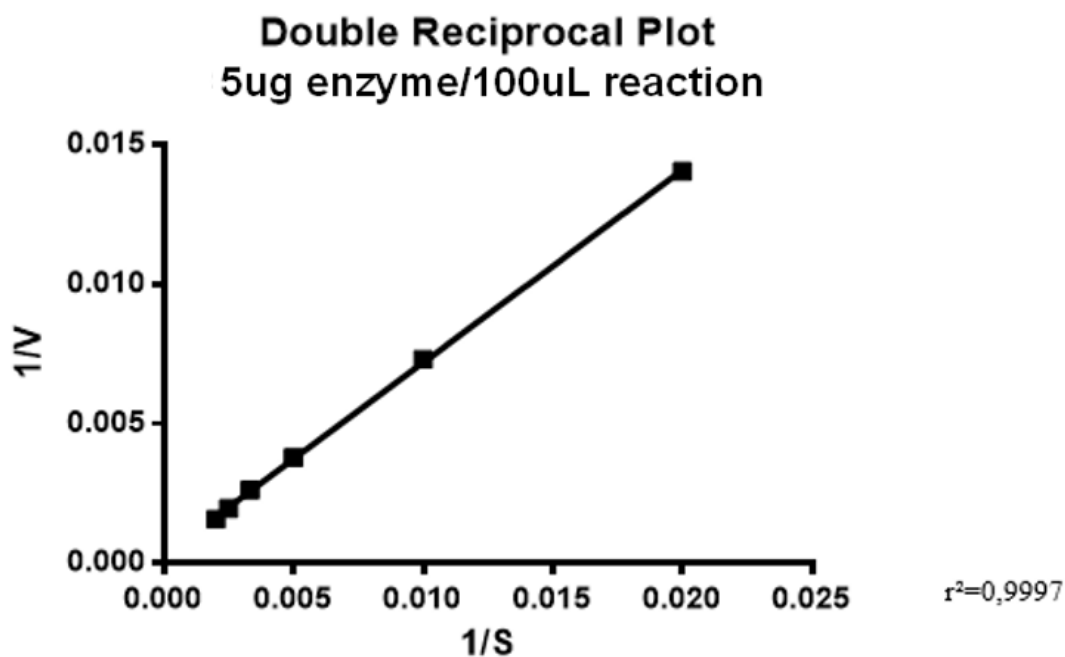
Για τη διερεύνηση της κινητικής του ενζύμου αρχικά κατασκευάσαμε το γνωστό διάγραμμα όπου μελετάται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει αυξανόμενων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (εικόνα 34).

SPB 20m M + DTT 1m M
5ug enzyme/100uL reaction



Εικόνα 34: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης ($\mu\text{mol H}_2\text{S}/\text{min}$ of the reaction/ μg enzyme) αυξανόμενης της συγκέντρωσης υποστρώματος για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου

Με στόχο τον προσδιορισμό των σταθερών Michaelis-Menten προβήκαμε στη μετατροπή του ανωτέρω διαγράμματος στο διάγραμμα διπλού αντιστρόφου. Οι συγκεντρώσεις υποστρώματος που επελέγησαν για το διάγραμμα των Lineweaver-Burk ανήκαν στη γραμμική περιοχή του διαγράμματος V-[3MP].¹⁰⁷ Το πείραμα με 5 μg ενζύμου/100 μL αντίδρασης και αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος σε διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM επαναλήφθηκε 4 φορές προς εύρεση του μέσου όρου (εικόνα 35). Με τη βοήθεια της εξίσωσης Lineweaver-Burk, οι σταθερές Michaelis-Menten προσδιορίστηκαν από τις τομές της ευθείας με τους άξονες.



Εικόνα 35: Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου προς εύρεση των σταθερών Michaelis-Menten της ενζυμικής αντίδρασης

Λαμβάνοντας το μέσο όρο, οι σταθερές Michaelis-Menten που χαρακτηρίζουν το ανασυνδυασμένο ένζυμο GST-h3MST στις δοθείσες πειραματικές συνθήκες είναι:

$V_{max} = 2856,171 \pm 314,263 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ug}$ ενζύμου

$K_m = 1688,626 \pm 258,572 \text{ } \mu\text{M}$

Έπειτα από αναζήτηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σε σχέση με τον προσδιορισμό των σταθερών Michaelis-Menten του ενζύμου 3MST, διαπιστώθηκε πως τα αποτελέσματα παρουσίαζαν μεγάλη μεταβλητότητα.^{17,44,90,114-119} Η προέλευση του ενζύμου -εάν αυτό αντιστοιχούσε στην ανθρώπινη αλληλουχία ή σε αρουραίου-, ο τρόπος με τον οποίο αυτό απομονώθηκε -που συνεπάγεται αυτόματα και την καθαρότητά του-, η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε με στόχο τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου, αλλά και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβε χώρα η ενζυμική αντίδραση, αποτελούν μερικούς μόνο λόγους που ενδέχεται να ευθύνονται για την απόκλιση των τιμών των σταθερών. Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 2.6., οι σημαντικότεροι παράγοντες που πρέπει να επιλέγονται με προσοχή κατά την ενζυμική αντίδραση είναι η συγκέντρωση των αντιδρώντων (ένζυμο, υποστρώμα), το pH και φυσικά, η θερμοκρασία, για αυτό και στον κάτωθι πίνακα αναφέρονται οι αντίστοιχες συνθήκες στα διεξαχθέντα πειράματα.

| ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ | ΠΕΡΙΟΔΟΣ | ΕΝΖΥΜΟ | ΜΕΘΟΔΟΣ | Θ | pH | ΑΝΑΓΩΓΙΚΟ | K _m | V _{max} | K _{cat} | K _m /K _{cat} |
|---------------------------|--|--|-------------------------------|----|-----|------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Nakamura et al (117) | Eur. J. Biochem. 2000;267: 5621±5630 | GST-MST, cleavage with FXa. Plants of Arabidopsis thaliana L. ecotype Columbia and ecotype Wassilewskija | Rate of thiocyanate formation | 30 | | 50mM KCN | 11 mM (MST1), 72 mM (MST2) | | 9900 (MST1), 1800 (MST2) 1/min | |
| Williams R.A. et al (116) | J Biol Chem. 2003;278(3):1480-1486 | 3MST Leishmani a major, 6-his tag | Lead sulfide assay- | 37 | 7,3 | 5 mM mercaptoethanol | 0,2 mM | 345 μmol/min/mg protein | 1,73 x 10 ⁵ 1/min | |
| Wloddek et al (115) | Acta Biochimica Polonica, 1982;29(1-2) | Rat erythrocytes from thw blood of albino rats | Rate of pyruvate formation | 37 | 7,5 | 0,5M β-mercaptoethanol | 7,54 mM | | | |
| Porter D.W. et al (90) | J. BIOCHEM TOXICOLOGY 1995;10 | Enriched MST fraction from bovine kidney | Thiocyanate production | 30 | 8 | 0,4mM DTT | 5,6mM | | | |

| ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ | ΠΕΡΙΟΔΙ ΚΟ | ΕΝΖΥΜΟ | ΜΕΘΟΔΟΣ | Θ | pH | ΑΝΑΓΩΓΙΚΟ | K _m | V _{max} | K _{cat} | K _m /K _{cat} |
|-------------------------|---|---|---|----|------|-----------------------|---------------------|----------------------|---|---|
| Kimura Y. et al (22) | Scientific Reports 2015 | 3MST | Production of H ₂ S ₃ - fluorescence | | | | 4,5 mM | | | |
| Kuo M. et al (119) | Am J Heart Circ Physiol 2016;310: H71-H79 | Rat liver homogenate Tissue sample | In vitro amperometric measurement of tissue H ₂ S Production | 37 | 7,4 | 1mM DTT | 0.46 ± 0.08 mM 3-MP | 254.1 ± 9.6 nM H2S/h | | |
| Nagahara N. et al (118) | J Biol Chem. 1996;271(44): 27395-27401 | Rat liver | Rate of pyruvate formation | | 9,55 | 25 mM mercaptoethanol | 1,2 ± 0,1 mM | | (4 ± 0,1) X 10 ⁵ l/min | K _{cat} /K _m (2,4 ± 0,1) X 10 ⁵ l/ml/min |
| Nagahara N et al (114) | J Biol Chem. 1995; 270(27) | Rat liver | Rate of pyruvate formation | | 9,55 | 25 mM mercaptoethanol | 1,2 ± 0,1 mM | | (2,3 ± 0,1) X 10 ^{5g} l/ml/min | (1,9 ± 0,1) X 10 ^{5g} l/ml/min |
| Fräsdorf B et al (44) | J Biol Chem. 2014;289(50): 34543-34556 | Human (GST-fused, cleaved with thrombin) | Methylene blue | 37 | 10,5 | | 0,55 ± 0,06 mM | | 1252 ± 16 (l/min) | 2289 l/min/mM |
| Yadav P.D. et al (17) | J Biol Chem. 2013;288(27): 20002-20013 | Human, Purified MST with an N-terminal His6 tag | Lead sulfide assay- | 37 | 7,4 | 25 mM DTT | 26 ± 5 uM | 11 ± 2 μmol/min/mg | 6,1 l/s | 1,3 l/ml/s |

Πίνακας 2: Συνοπτική καταγραφή των πειραμάτων κινητικής που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για το ένζυμο 3MST

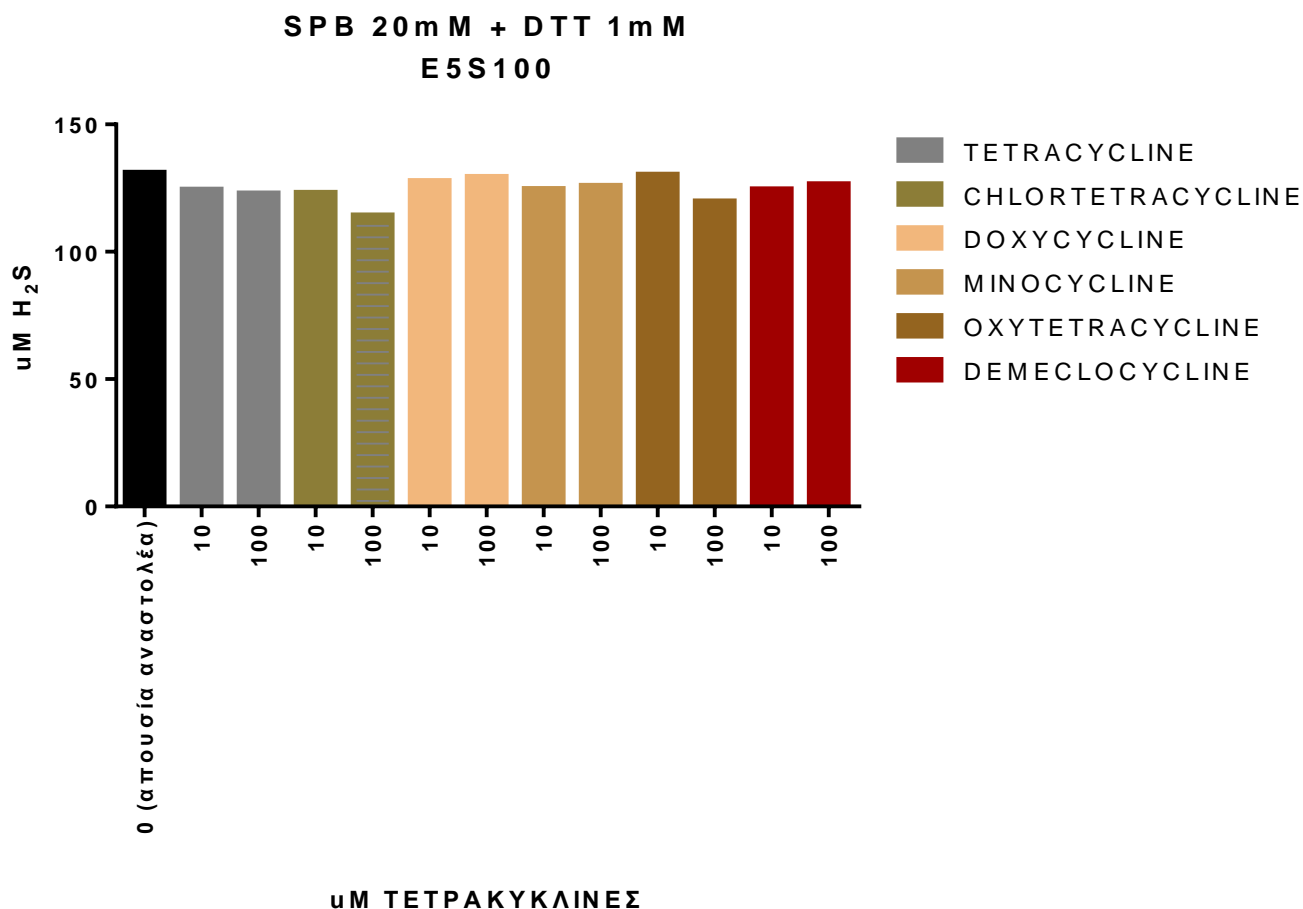
Η σταθερά Km για το ένζυμο GST-h3MST που υπολογίσαμε έπειτα από διερεύνηση της κινητικής με τη μέθοδο ‘methylene blue’ και τη χρήση του πρωτοκόλλου όπως αυτό περιγράφει, ομοιάζει με αυτή της ερευνητικής ομάδας με επικεφαλής τον ερευνητή Nagahara N (Km=1,2 mM).^{114,118}

3.4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Χάρη σε κεκτημένη γνώση του εργαστηρίου που προήλθε από πείραμα διαλογής υψηλής απόδοσης ή ‘high throughput screening’ όπως είναι ευρέως γνωστό, θελήσαμε να ελένξουμε με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο προσδιορισμού ‘methylene blue’ τις τετρακυκλίνες ως αναστολείς του ενζύμου 3MST.

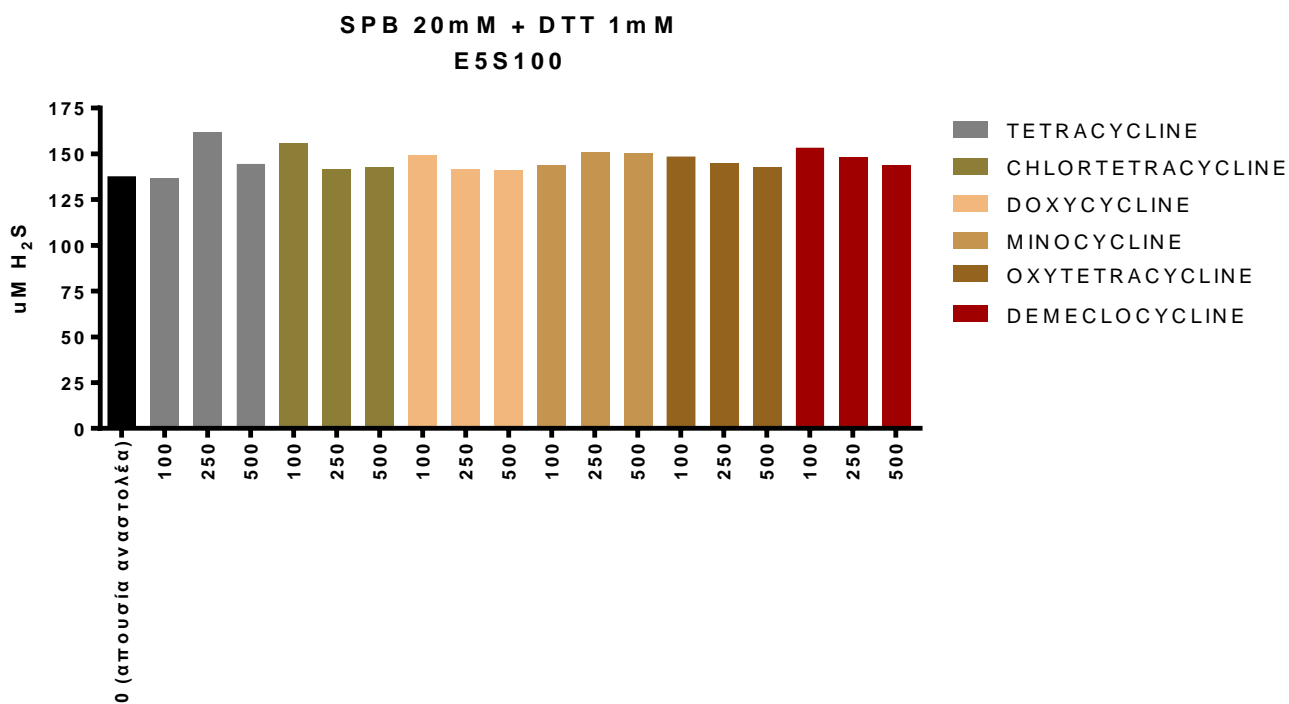
3.4.1. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ GST-h3MST

Σε πρώτο βήμα, δοκιμάσαμε 6 μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών σε συγκεντρώσεις 10 και 100 uM. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκαν με τη σειρά: το διάλυμα SPB 20mM + DTT 1mM, pH=8,2, 5 ug από το ένζυμο (0,8 uM), οι αναστολείς σε υδατικά διαλύματα με τελική συγκέντρωση 10 ή 100 uM και τέλος, το υπόστρωμα σε συγκέντρωση 100 uM. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε ένζυμο μετά από θέρμανση στους 60°C για μισή ώρα, το οποίο παρήγαγε αμελητέα ποσότητα υδροθείου, για αυτό και δεν κατέστη απαραίτητο να παρουσιαστεί στο διάγραμμα (εικόνα 36). Τα δείγματα αφορούν αντιδράσεις όγκου 100 uL και ετοιμάστηκαν με τέτοια αναλογία όγκων ώστε να προκύπτουν διπλέτες. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως αυτό έχει περιγραφεί αναλυτικά στις ενότητες 2.5.1. και 2.5.3.. Βάσει του διαγράμματος της εικόνας 36, οι τετρακυκλίνες δε φάνηκαν ως αναστολείς, αφού η προσθήκη του εκάστοτε μορίου δε μείωνε αισθητά τη συγκέντρωση του παραγόμενου υδροθείου, σε σύγκριση με το control -απουσία αναστολέα.



Εικόνα 36: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η επίδραση 6 μορίων τετρακυκλινών στην ενζυμική αντίδραση

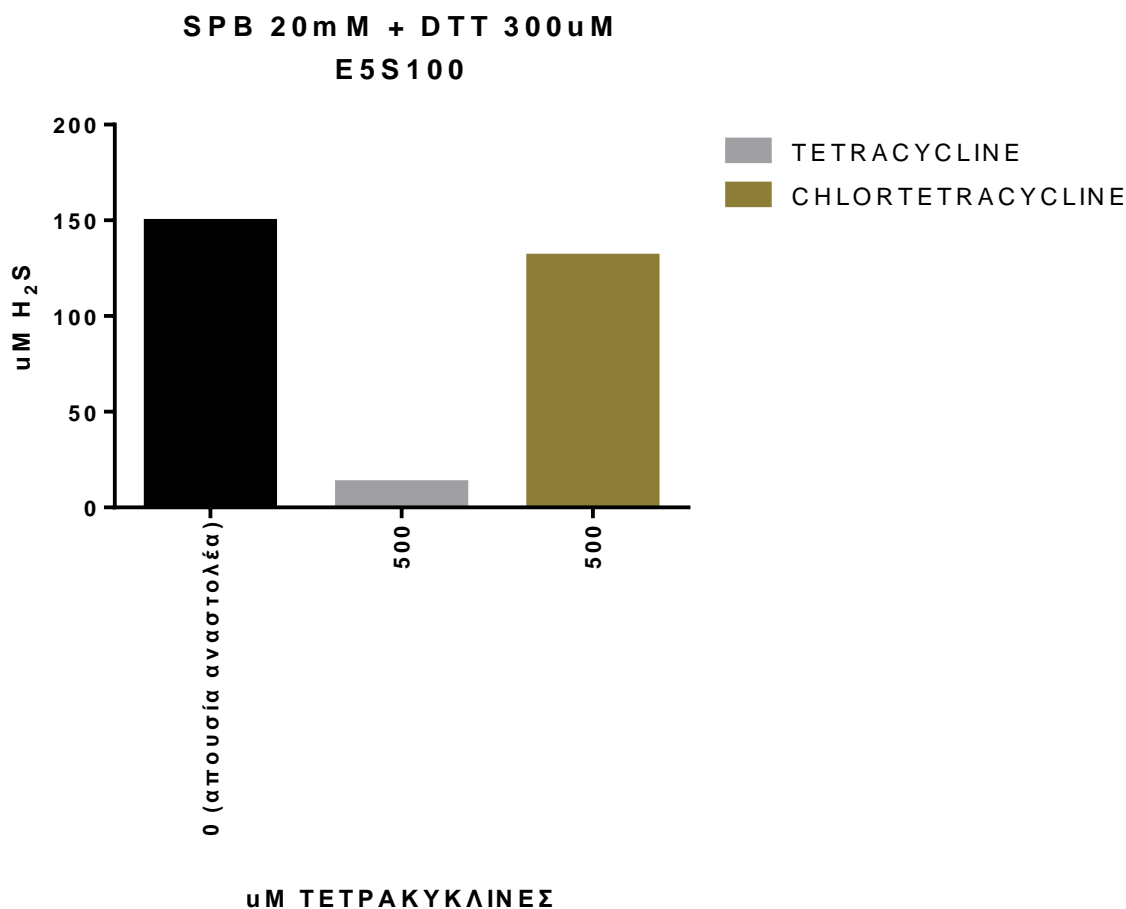
Ακολούθησε, λοιπόν, ένα δεύτερο πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήσαμε πιο υψηλές συγκεντρώσεις των προς διερεύνηση αναστολέων. Το πείραμα αυτό έδειξε πως ακόμα και όταν οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιήθηκαν σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση, αυτές δεν παρουσίαζαν καμία αναστολή (εικόνα 37).



uM ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

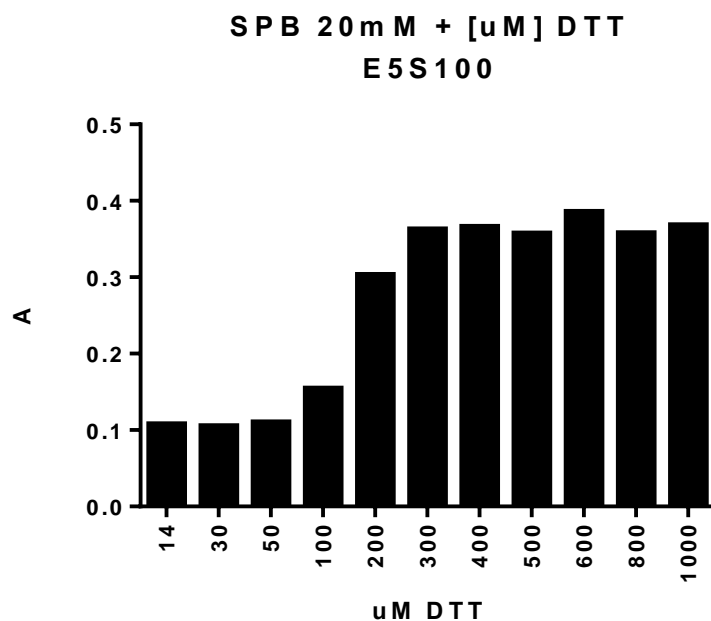
Εικόνα 37: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η επίδραση 6 μορίων τετρακυκλινών στην ενζυμική αντίδραση

Για την εξήγηση αυτού του ευρύματος που έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων που έχουν λάβει χώρα στο εργαστήριό μας, οι υποψίες στράφηκαν στο αναγωγικό DTT. Στο επόμενο πείραμα, λοιπόν, δοκιμάστηκαν δύο μόνο τετρακυκλίνες με το αντίστοιχο control τους παρουσία πολύ μικρότερης συγκέντρωσης αναγωγικού, περί τα 300 uM. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 38, η μικρή συγκέντρωση αναγωγικού απεκάλυψε την ανασταλτική δράση της τετρακυκλίνης, αφού το παραγόμενο υδρόθειο μειώθηκε κατακόρυφα.



Εικόνα 38: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η επίδραση 2 μορίων τετρακυκλινών στην ενζυμική αντίδραση

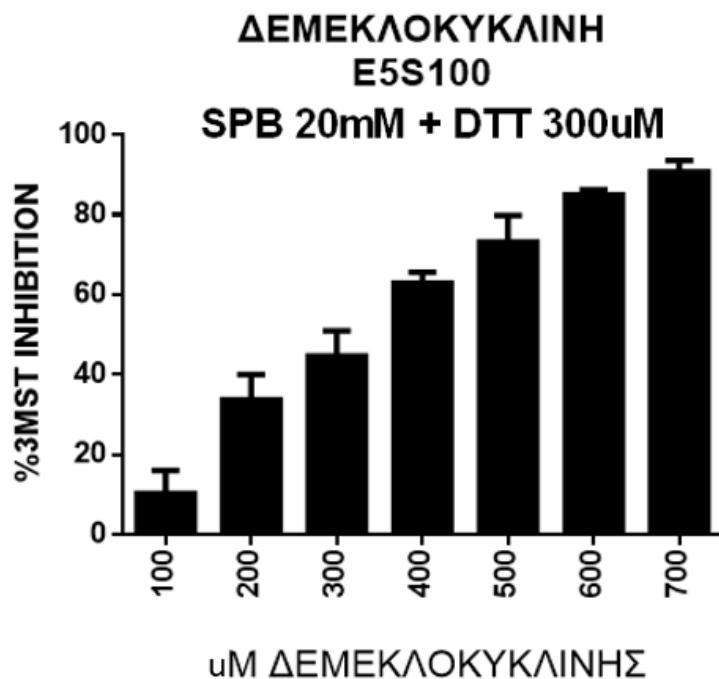
Με στόχο να περιορίσουμε όσο το δυνατόν τον παράγοντα του αναγωγικού, ώστε να μην καλύπτει την ανασταλτική δράση των μορίων και παράλληλα να επιτρέπει τη χρήση της εν λόγω μεθόδου προσδιορισμού ως αξιόπιστης, προβήκαμε στο επόμενο πείραμα. Στο πείραμα αυτό, δοκιμάσαμε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αναγωγικού για τις ίδιες συνθήκες -5 ug ενζύμου, 100 uM υποστρώματος ανά 100 uL αντίδρασης- με σκοπό να εντοπίσουμε την ελάχιστη συγκέντρωση αναγωγικού που απαιτείται για τη μεγιστοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης. Το πείραμα έδειξε τη συγκέντρωση 300 uM DTT ως τη βέλτιστη, δεδομένου πως από τη συγκέντρωση αυτή ξεκινά πλατώ (εικόνα 39).



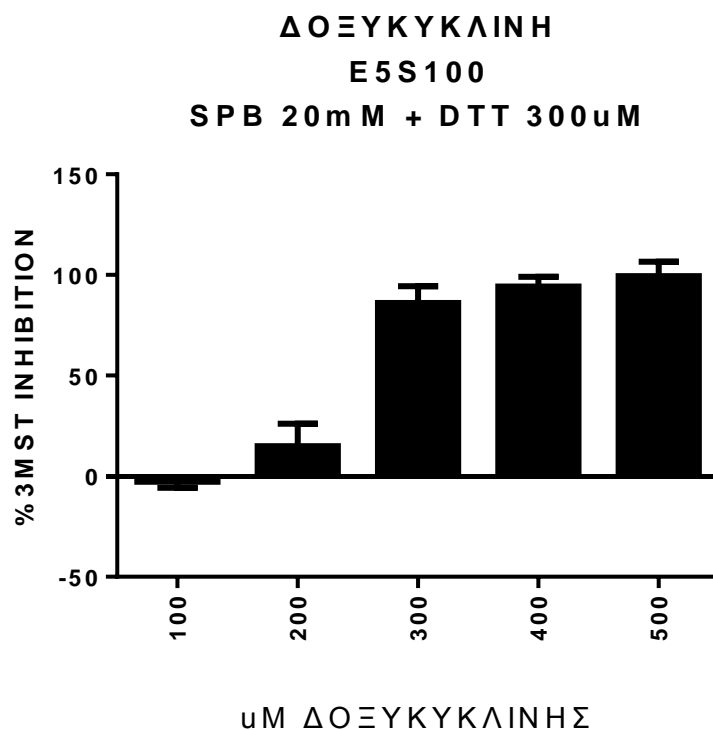
Εικόνα 39: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού (DTT) στην ενζυμική αντίδραση

Έχοντας πλέον ορίσει τις νέες συνθήκες του πειράματος (5ug ενζύμου, 100 uM υποστρώματος, Cf DTT=300 uM), ελέγχσαμε εκ νέου τις τετρακυκλίνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Όπως φαίνεται και από τα κάτωθι διαγράμματα (εικόνες 40-43), τα μόρια δεμεκλοκυκλίνη, δοξυκυκλίνη και τετρακυκλίνη παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη αναστολή του ενζύμου σε εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση. Ακόμη, στην περίπτωση της δεμεκλοκυκλίνης, η αναστολή του ενζύμου κατά το ήμισυ της δραστητικότητάς του επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις περί τα 300-400 uM της ένωσης. Αντίστοιχα, η τετρακυκλίνη επιτυγχάνει το ίδιο αποτέλεσμα σε συγκέντρωση 300 uM, όπως και η δοξυκυκλίνη, της οποίας όμως η ανασταλτική δράση παρουσιάζει εξαιρετικά απότομη αύξηση, σε εύρος συγκεντρώσεων 200-300 uM. Η απότομη αυτή αύξηση ίσως αποτελεί ενδιαφέρον στοιχείο προς έρευνα, με γνώμονα τη συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών της ένωσης με τη σύνδεση και δράση επί του ενζύμου. Στην περίπτωση της οξυτετρακυκλίνης, η υψηλή συγκέντρωση της ένωσης δεν είναι αρκετή να προκαλέσει πλήρη αναστολή του ενζύμου, ωστόσο ακόμα και συγκέντρωση ίση με 100 uM προκαλεί αναστολή της τάξης του 30%, ποσοστό ιδιαίτερα υψηλό σε σύγκριση με τα τρία προαναφερθέντα μόρια.

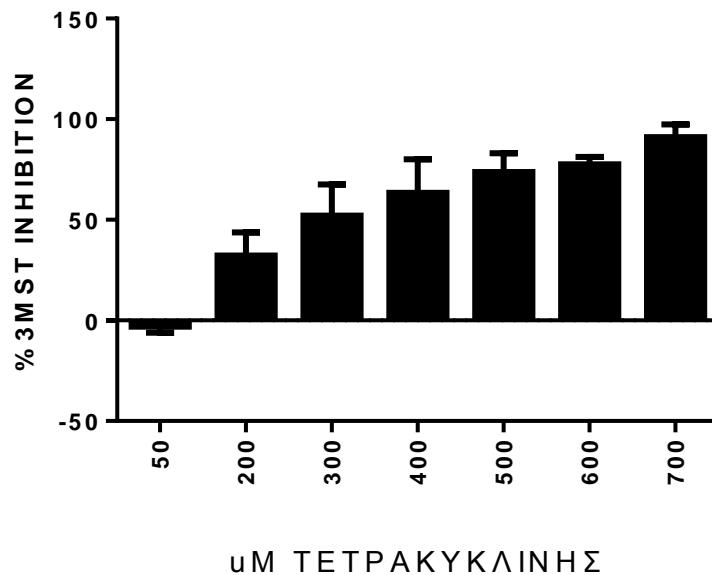


Εικόνα 40: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου GST-h3MST παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεμεκλοκυκλίνης



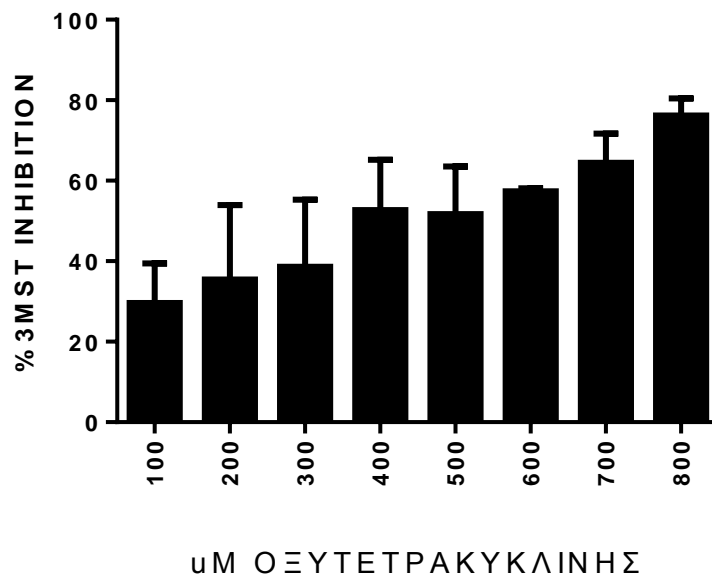
Εικόνα 41: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου GST-h3MST παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δοξυκυκλίνης

**ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ
E5S100
SPB 20mM + DTT 300uM**



Εικόνα 42: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου GST-h3MST παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων τετρακυκλίνης

**ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ
E5S100
SPB 20mM + DTT 300uM**



Εικόνα 43: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου GST-h3MST παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων οξυτετρακυκλίνης

Αξίζει να σημειωθεί πως για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων βιοχημικών πειραμάτων όπου χρησιμοποιείται απομονωμένο ένζυμο, η χρήση όρων όπως ο ευρέως γνωστός I(nhibitory)C(oncentration)₅₀, δε βοηθούν -αν δεν παραπλανούν- στην ανάλυση και εξαγωγή συμπερασμάτων.

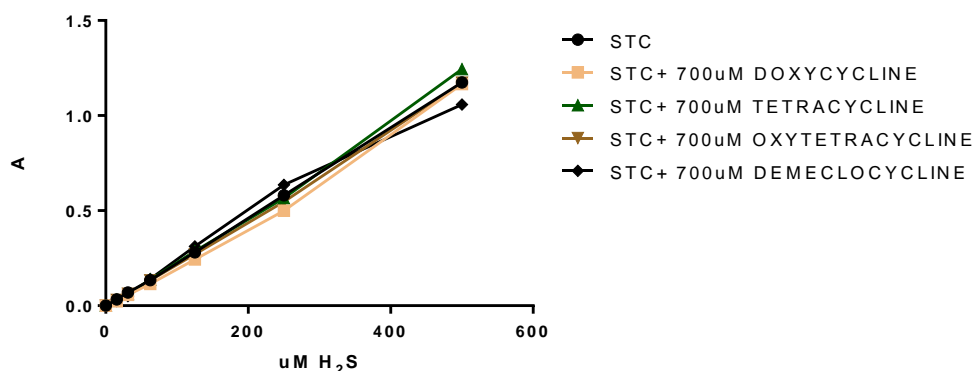
Με τον όρο IC₅₀ στο συγκεκριμένο πείραμα, περιγράφεται η συγκέντρωση του αναστολέα που είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή του ενζύμου κατά 50%. Σημειώνεται πως υπάρχει διάκριση μεταξύ της σχετικής και απόλυτης τιμής IC₅₀: σε περιπτώσεις όπως αυτή της οξυτετρακυκλίνης όπου δεν επιτυγχάνεται απόλυτη αναστολή του ενζύμου, η σχετική IC₅₀ αναφέρεται στη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί τη μισή αναστολή, από τη μέγιστη η οποία μπορεί να επιτευχθεί από τον εν λόγω αναστολέα. Η παράμετρος αυτή αντανακλά την αποτελεσματικότητα (functional strength) της ουσίας και πρέπει να συμπροσδιορίζεται από τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος και βάσει αυτών να αξιολογείται. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση τόσο του ενζύμου, όσο και του υποστρώματος μπορούν να μεταβάλουν την τιμή IC₅₀ του ίδιου μορίου. Αύξηση του ενζύμου συνεπάγεται και αυξημένη συγκέντρωση του απαιτούμενου αναστολέα για να επέλθει 50% αναστολή του ενζύμου. Αντίστοιχα, αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος συνεπάγεται αύξηση της τιμής IC₅₀, σε περίπτωση που η ουσία δρα με συναγωνιστική αναστολή επί του ενζύμου. Καθίσταται σαφές, λοιπόν, πως και ο τύπος της ενζυμικής αναστολής ή στοιχεία της αντίδρασης (όπως η χρήση ενέργειας με τη μορφή ATP) μπορεί να αποκαλύψουν κι άλλους παράγοντες από τους οποίους να εξαρτάται η εν λόγω παράμετρος. Ένα ακόμη μειονέκτημα της τιμής IC₅₀ αποτελεί το κατώτερο όριο αυτής, μιας και ο αναστολέας με την πλέον ισχυρή συγγένεια με το ένζυμο, δεν μπορεί να επιτύχει τιμή IC₅₀ μικρότερη από τη μισή συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε στον πειραματικό προσδιορισμό της παραμέτρου. Η σημασία των ανωτέρω επισημάνσεων στην εξήγηση βιοχημικών δεδομένων γίνεται εύκολα αντιληπτή κατά τη σύγκριση τιμών IC₅₀. Σε περίπτωση που η σύγκριση γίνεται χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν οι πειραματικές συνθήκες, η εξαγωγή συμπερασμάτων είναι ιδιαίτερα επισφαλής, με τους αναστολείς να υποτιμώνται ή αντίθετα να υπερεκτιμώνται.¹¹⁰⁻¹¹³

3.4.2. ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Με στόχο να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η ανασταλτική δράση ορισμένων τετρακυκλινών να οφείλεται σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού, ετοιμάσαμε καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις δότη σουλφιδίου και σε αυτή προσθέσαμε πολύ υψηλή συγκέντρωση (700 μM) μίας τετρακυκλίνης. Το διάγραμμα της εικόνας 44 αποδεικνύει πως οι τετρακυκλίνες δεν

επηρεάζουν την απορρόφηση που δίνει το μόριο του υδροθείου και άρα, η μείωση του σήματος που παρατηρούσαμε στα προηγούμενα πειράματα είναι αποτέλεσμα πραγματικής αναστολής του ενζύμου.

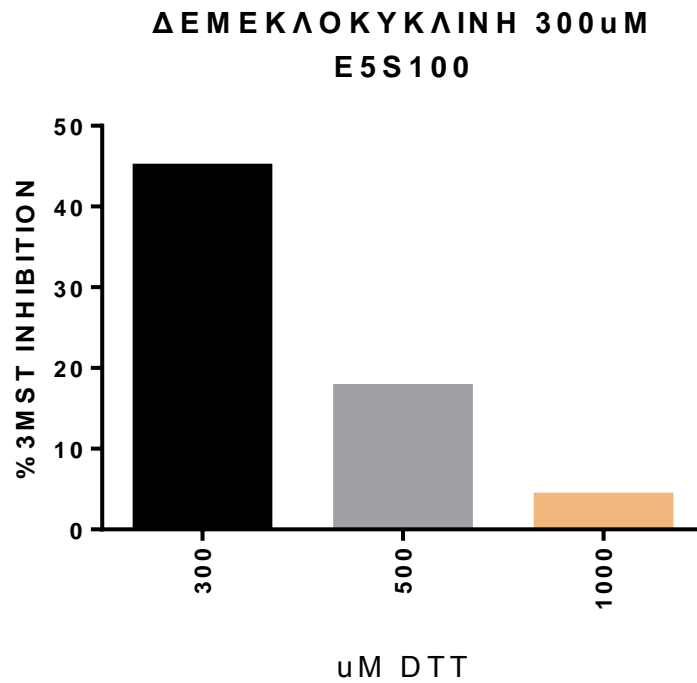
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ



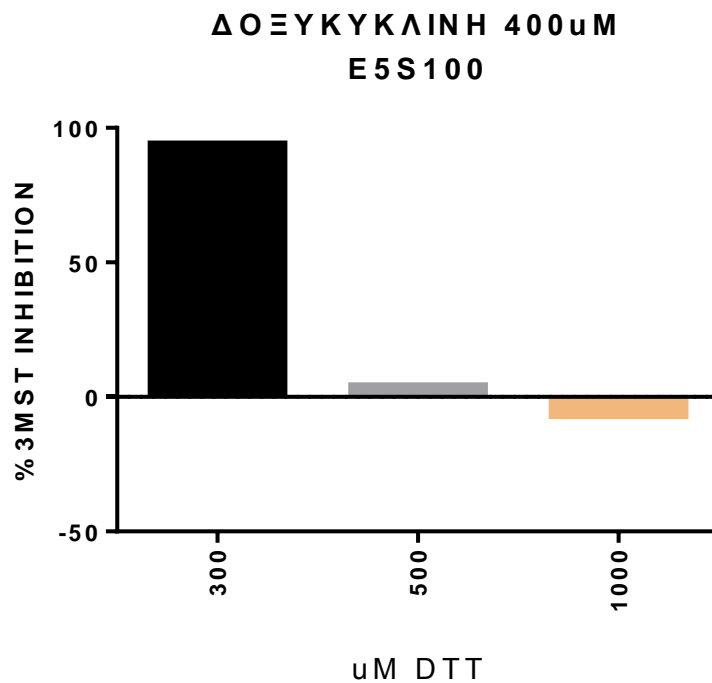
Εικόνα 44: Διάγραμμα όπου συγκρίνονται οι απορροφήσεις γνωστών συγκεντρώσεων H₂S απουσία και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης τετρακυκλίνης

3.4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DTT ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Θέλοντας να διερευνήσουμε τη συσχέτιση του αναγωγικού με τη δράση των τεσσάρων μορίων που αξιολογήθηκαν ως αναστολείς του ενζύμου 3MST, σχεδιάσαμε το κάτωθι πείραμα. Στο πείραμα αυτό συγκρίναμε το ποσοστό αναστολής του ενζύμου 3MST διατηρώντας σταθερές τις συνθήκες (συγκέντρωση ενζύμου, υποστρώματος, τετρακυκλίνης), παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων DTT. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών (εικόνες 45, 46 και 47), φαίνεται πως αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αναγωγικού παρατηρείται μείωση του ποσοστού αναστολής που επιτυγχάνει η ίδια συγκέντρωση τετρακυκλίνης. Σημειώνεται πως και η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει παρόμοιες τάσεις με την αύξηση του αναγωγικού (τα αποτελέσματα των αντίστοιχων πειραμάτων δεν παρουσιάζονται).

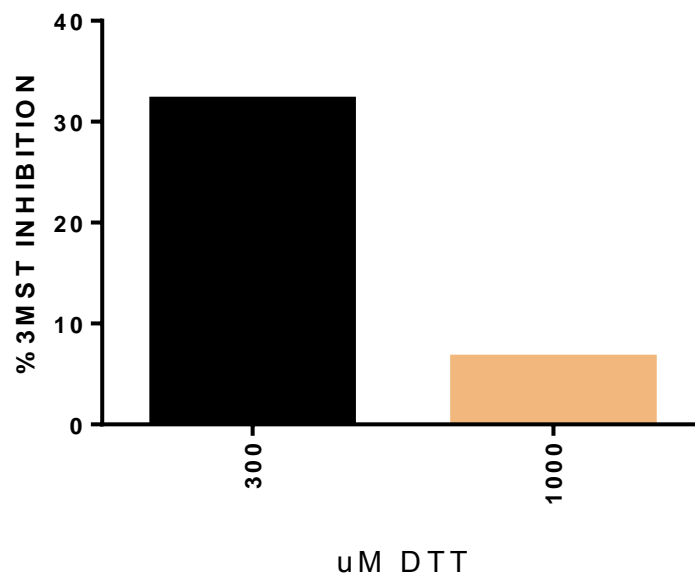


Εικόνα 45: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου υπό τη δράση 300 μ M δεμεκλοκυκλίνης, παρουσία τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού



Εικόνα 46: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου υπό τη δράση 400 μ M δοξυκυκλίνης, παρουσία τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού

**ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ 200 μ M
E5S100**



Εικόνα 47: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής του ενζύμου υπό τη δράση 200 μ M τετρακυκλίνης, παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων αναγωγικού

ΕΝΟΤΗΤΑ 4η :
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος του υδροθείου ως ο τρίτος αέριος διαβιβαστής ενδογενώς, μετά το NO και το CO, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με την τοξική του δράση, για την οποία ήταν μόνο γνωστό στην παγκόσμια κοινότητα πριν λίγα χρόνια. Η συμμετοχή του H₂S σε ένα μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών καθιστά σαφή πλέον τον εξέχοντα ρόλο του σε συστήματα όπως το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό και πλήθος άλλων. Διαταραχές στην ομοιόσταση του αερίου αυτού διαβιβαστή έχουν συσχετιστεί με ποικίλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, προσδίδοντας ιδιαίτερη αίγλη στην έρευνα με στόχο την ανακάλυψη μορίων με ανασταλτική ή ενισχυτική δράση επί των ενζύμων βιοσύνθεσής του. Αν και έχουν ταυτοποιηθεί ορισμένα μόρια με ανάλογη δράση, τα οποία συμπλέκονται με ορισμένη εξειδίκευση με τα ένζυμα CBS και CSE, εντούτοις, το τρίτο ένζυμο παραγωγής υδροθείου στερείται αντίστοιχης βιβλιογραφίας. Μόλις πριν λίγους μήνες δημοσιεύθηκε η πρώτη έρευνα όπου παρουσιάζονταν μόρια με αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση επί του συγκεκριμένου ενζύμου.³⁸

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτύχαμε τη βελτιστοποίηση και κατάλληλη τροποποίηση της ευρέως χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου ‘methylene blue’, καθιστώντας τη μέθοδο αξιόπιστη, όπως αυτό φαίνεται από την ειδικότητα του σήματος κατά τον έλεγχο με τα αντίστοιχα controls. Στη συνέχεια, με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο διερευνήσαμε την κινητική του χιμαιρικού ενζύμου GST-h3MST. Οι αναφερθείσες σταθερές Michaelis-Menten στη βιβλιογραφία παρουσίαζαν μεγάλη διακύμανση, γεγονός που εξηγείται από τις αποκλίσεις στις πειραματικές μεθόδους.^{17,44,90,114-119} Σημειώνεται πως η σταθερά Km που προέκυψε από τα πειραματικά μας δεδομένα (Km=1,7 mM) ομοιάζει με αυτή της επιστημονικής ομάδας του ερευνητή Nagahara N (Km=1,2 mM).^{114,118}

Σε δεύτερο επίπεδο, εξετάσαμε τη δράση έξι μορίων που ανήκουν στην κατηγορία των τετρακυκλινών επί του ενζύμου παραγωγής υδροθείου, GST-h3MST. Τέσσερα μόρια εξ'αυτών παρουσίασαν ανασταλτική δράση ιδιαίτερα ικανοποιητική, εάν συνυπολογισθούν οι συνθήκες του πειράματος: οι συγκεντρώσεις ενζύμου και υποστρωμάτων (100 uM 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό, 300 uM DTT). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν αναλογισθούμε την πενιχρή υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τους αναστολείς επί του συγκεκριμένου ενζύμου βιοσύνθεσης του υδροθείου. Για το χαρακτηρισμό της δυναμικής των αναστολέων αυτών προτείνεται ο προσδιορισμός της σταθεράς Ki. Η παράμετρος αυτή αντανάκλα τη συγγένεια της υπό μελέτη ουσίας με το ένζυμο και αποτελεί ένδειξη της δυναμικής του αναστολέα, αφού όσο μικρότερη είναι η σταθερά, τόσο καλύτερος/ισχυρότερος ο αναστολέας. Στα θετικά στοιχεία αυτής της παραμέτρου συγκαταλέγεται η μη επιρροή της από τις

συνθήκες του πειράματος (συγκέντρωση ενζύμου και υποστρώματος), στοιχεία που καθιστούν τη σύγκριση αναστολέων για το ίδιο ένζυμο εφικτή. Ο δείκτης K_i αφορά στη συγκέντρωση του αναστολέα που επιτυγχάνει διπλασιασμό της κλίσης της ευθείας Lineweaver-Burk και βάσει αυτού μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια.^{107,112,113}

Ακόμη, επιπλέον πειράματα μάς έδωσαν ικανοποιητικά στοιχεία για να υποθέσουμε με σχετική ασφάλεια το μηχανισμό δράσης αυτών των ενώσεων. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα στην παράγραφο 3.4.3, η αύξηση της συγκέντρωσης του αναγωγικού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού αναστολής του ενζύμου στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η επίδραση του αναγωγικού DTT στην απόκρυψη της ανασταλτικής δράσης των τετρακυκλινών ενδέχεται να αποτελεί δείκτη του μηχανισμού δράσης. Υποθέτουμε, λοιπόν, πως η τετρακυκλίνη 'κλειδώνει' το ένζυμο στη δομή περσουλφιδίου της κυστεΐνης 248 του ενεργού κέντρου, στο πρώτο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης και δεν επιτρέπει στο αναγωγικό να συνδεθεί σε δεύτερο χρόνο με το ένζυμο, απελευθερώνοντας το υδρόθειο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του αναγωγικού φαίνεται να ξεπερνά την ανασταλτική δράση των τετρακυκλινών, για αυτό και σε εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση αναγωγικού, η δραστηριότητα του ενζύμου δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη των συγκεκριμένων αναστολέων. Οι τετρακυκλίνες, άρα, φαίνεται να ασκούν την ανασταλτική τους δράση ανταγωνιζόμενες τη σύνδεση του αναγωγικού επί του ενζύμου. Υπενθυμίζεται σε αυτό το σημείο πως το αναγωγικό αναφέρεται σε πλήθος μελετών ως δεύτερο υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.³⁸⁻⁴⁰ Ένα ακόμη ενδιαφέρον στοιχείο είναι πως ο πιθανός μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης των τετρακυκλινών συμφωνεί με αυτόν που περιγράφηκε στην εισαγωγή, για τους αναστολείς του ενζύμου 3MST που δημοσιεύθηκαν πρόσφατως.³⁸ Ακόμη, δεδομένου πως το σχηματισθέν περσουλφίδιο κατά το πρώτο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης είναι ιδιαίτερα σταθερό, ίσως η δομή αυτή του ενζύμου να αποτελεί τη δομή-στόχο για την ανακάλυψη νέων μορίων με ανασταλτική δράση επί του 3MST στο μέλλον.

Με στόχο την εξακρίβωση του μηχανισμού δράσης των μορίων αυτών, ένα πιθανό πείραμα αποτελεί ο προσδιορισμός της ομάδας περσουλφιδίου με τη βοήθεια εξειδικευμένης αναλυτικής μεθόδου. Η πιθανή αύξηση της συγκέντρωσης της δομής του ενζύμου με την ομάδα -SSH, παράλληλα με την αύξηση του αναγωγικού, σε πείραμα όπου θα διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση ενζύμου, υποστρώματος και αναστολέα, θα ενίσχυε ακόμη περισσότερο τον προτεινόμενο μηχανισμό αναστολής. Οφείλουμε, όμως, να αναφέρουμε πως η ανίχνευση αυτής της δομής της πρωτεΐνης αποτελεί πραγματική πρόκληση για τον τομέα της Ανάλυσης, αφού η δομή περσουλφιδίου παρουσιάζει παρόμοια δραστηριότητα με τις ελεύθερες θειόλες, -SH.^{10,36,38,44}

Πέρα από το μηχανισμό της ανασταλτικής δράσης των τεσσάρων αυτών μορίων, ο προσδιορισμός του είδους της αναστολής αποτελεί έναν ακόμη μετέπειτα στόχο. Η αλλαγή στις σταθερές Michaelis-Menten, έπειτα από επανάληψη των πειραμάτων κινητικής με την προσθήκη σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα, μπορεί να προσδιορίσει το ζητούμενο αυτό.

Η εύρεση μορίων με ανασταλτική δράση, η οποία να εμφανίζεται σε μικρή συγκέντρωση της ουσίας, δεν αποτελεί μοναδική προϋπόθεση για την ανακάλυψη αναστολέων. Εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι η εκλεκτικότητα του συγκεκριμένου αναστολέα ως προς το ένζυμο-στόχο. Καθίσταται σαφές, λοιπόν, πως απαραίτητο μετέπειτα πείραμα αποτελεί ο έλεγχος της δράσης των τεσσάρων αυτών επίδοξων αναστολέων επί των δύο άλλων ενζύμων παραγωγής υδροθείου, CBS και CSE. Οι ενώσεις αυτές πρέπει να ελεγχθούν και ως προς το ένζυμο ροδανάση με το οποίο το 3MST παρουσιάζει υψηλή δομική ομοιότητα, καθώς και με άλλα ένζυμα, όπως το SQR, τα οποία σχηματίζουν δομή περσουλφιδίου στο μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης.^{38,120}

Σε περίπτωση που τα ανωτέρω πειράματα επιβεβαιώσουν την ικανοποιητικά ανασταλτική και εκλεκτική δράση των τεσσάρων αυτών τετρακυκλικών, το αποτέλεσμα αυτό θα μας ωθήσει στη διεύρυνση των πειραμάτων σε επίπεδο μοριακής προσομοίωσης. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της υπολογιστικής χημείας θα αναζητηθούν μόρια με παρόμοιες στερεοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες, τα οποία να παρουσιάζουν καλύτερη ανασταλτική ή/και εκλεκτική δράση. Η σχεδίαση ισχυρότερων αναστολέων αποτελεί τον επόμενο στόχο αυτής της μελέτης, με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα για την αποκρυπτογράφηση του ρόλου τόσο του ενζύμου 3MST στον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και του αέριου διαβιβαστή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wang R., *Physiol. Rev.* 2012; 92: 791–896
2. Reiffenstein RJ et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992; 32:109-134
3. Szabo C et al., *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6 (11): 917-935
4. Li et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 51:169-187
5. Goodwing LR et al., *J. Anal. Toxicol.* 1989; 13: 105-109
6. Warenycia MW et al., *Biochem. Pharmacol.* 1989; 38: 973-981
7. Shatalin K et al., *Science* 2011; 334 (6058): 986-990
8. Webb D.G. et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008; 324 (2):876-882
9. Hughes M.N. et al., *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47:1346-1353
10. Philip K.Moore, Matt Whitemann, *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*, Springer
11. Kimura Abe et al., *J. Neurosci* 1996; 16:1066-1071
12. Beauchamp R. et al., *CRC Crit Rev Toxicol* 1984;13: 25-97
13. Barr LA et al., *Circ. J.* 2014; 78 (9): 2111-8
14. Wang R., *FASEB J.* 2002; 16 (13): 1792-1798
15. Wang R. et al., *Humana Press* 2004; 94 (1):139
16. Ishigami M et al., *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:205-214
17. Yadav P.K. et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2013;288(27):20002-20013
18. Kabil O et al., *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:1355-1366
19. Kolluru G.K. et al., *Nitric Oxide.* 2013; 35: 5–20
20. Ida T et al., *PNAS* 2014;111(21):7606-7611
21. Yadav P.K. et al., *Journal of The American Chemical Society* 2016; 138(1):289-99
22. Kimura Y. et al., *Scientific Reports* 2015 ;5:14774
23. Kimura Y. et al., *FASEB J* 2013; 27:2451–2457
24. Rose et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 74 (8), 1391-1412
25. Stryer Lubert, Berg Jeremy, John Tymoczki (2012), *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*
26. Patel P. et al., *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7(10)
27. Kaneko Y et al., *Diabetes* 2006;55:1391-1397
28. Wallace et al., *Nature Reviews Drug Discovery* 2015;14: 329-345
29. Stipanuk MH, *Annu Rev Nutr* 1986; 6:179–209
30. Singh S et al., *Biochim Biophys Acta* 2011; 1814:1518–1527.
31. Diwakar L et al., *Neurochem Int* 2007; 50:418–426.
32. Nagahara N et al., *Methods in Enzymology* 2015;554

33. Nagahara N et al., *Histochemistry and Cell Biology* 1998;110:243-250
34. Shibuya N et al., *J Biochem* 2009;146:623–626.
35. Shibuya N et al., *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:703–714
36. Nagahara N. et al., *J Biol Chem* 2007; 282:1561–1569.
37. Kraout J, *Ann Rev Biochem* 1977;46:331-358
38. Hanaoka K et al., *Scientific Reports* 2017;7:40227
39. Jurkowska H et al., *Acta Biochemica Polonica* 2007;54(2):407-411
40. Westrop G.D. et al., *J Biol Chem.* 2009; 284(48): 33485-33494
41. Mikami Y et al., *Biochem J* 2011; 439, 479–485
42. Rashid S et al., *British Journal of Pharmacology* 2013;168:1902-1910
43. Nagahara N et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(41): 34569–34576
44. Frasdorf B et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(50): 34543-34556
45. Modis K et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;433:401–407
46. Kabil O et al., *Antioxid Redox Signal* 2014;20:770–782
47. Tang XQ et al., *J Mol Neurosci* 2013; 50:70–77
48. Weghe V et al., *J Biol Chem* 1999;274:13250–13257
49. Olson KR, *Antioxid Redox Signal* 2015; 22:377–397
50. Kabil O et al., *J Biol Chem* 2012; 287:44561–44567
51. Sun YG et al., *Cardiovasc Res* 2008; 79:632–641
52. Hu LF et al., *J Neurochem* 2007; 100:1121–1128.
53. Pryor WA et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp* 2006; 291:R491–R511
54. Sen N., *J Mol Biol* 2017; 429: 543–561
55. Coletta C. et al., *PNAS* 2012; 109 (23): 9161-9166
56. Papapetropoulos A et al., *PNAS* 2009; 106(51): 21972-2
57. Yang G et al., *FASEB J* 2004; 18: 1782–1784
58. Xu M et al., *Sheng Li Xue Bao* 2008; 60: 175–180
59. Sivarajah A et al., *Shock* 2009; 31: 267–274
60. Sun YG et al., *Cardiovasc. Res.* 2008; 79 : 632-641
61. Ryter, S. et al., *Physiol. Rev.* 2006;86: 583–650
62. Ishii. I. et al., *Biochem. J.* 2004;381: 113–123
63. Hill, B. C. et al., *Biochem. J.* 1984;224: 591–600
64. Khan, A. A. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1990; 103: 482–490
65. Gubern, M. et al., *FASEB J.* 2007;21:1699–1706
66. Mani S et al., *Circulation* 2013; 127 (25): 2523-2534
67. Cheung SH et al., *PLoS One* 2014;9(11):e113038.
68. Xu S et al., *Int J Cardiol.* 2014; 172(2):313-7

69. Yang G et al., *Science* 2008; 322 (5901): 587-590
70. Shen Y et al., *Antioxid Redox Signal.* 2015; 22(3): 224–240
71. Bryan S et al., *Exp Clin Cardiol.* 2011;16(4):e36-41
72. Zhang G et al., *Am J Pathol.* 2013 Apr; 182(4):1188-95.
73. Bos EM et al., *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(5):759-70
74. Zhu W et al., *Biochemistry* 2008;47(23): 6226-6232
75. Blom HJ et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011; 34 (1): 75-81
76. Chang L et al., *Amino Acids.* 2008; 34: 573–585
77. Stabler SP et al., *Metabolism.* 2002; 51: 981–988
78. Sen U et al., *Cell Biochem Biophys.* 2010; 57(2-3): 49–58
79. Jakubowski H et al., *J Nutr* 2006; 136 (6 Suppl): 1741S-1749S
80. Sen U et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300 (1): C155-C163
81. Nagahara N et al., *Scientific Reports* 2013;3:1986
82. Sun Q et al., *J Biol Chem* 2009; 284:3076–3085.
83. Marcotte P et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 62:677–682
84. d’Emmanuele di Villa Bianca R et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:4513–4518
85. Oh GS et al., *Free Radic Biol Med* 2006; 41:106–119.
86. Roy A et al., *Am J Hypertens* 2012;25:74–81.
87. Asimakopoulou A et al., *Br J Pharmacol* 2013; 169(4): 922-32
88. Akagi R, *Acta Med Okayama* 1982;36:187–197
89. Rekowski et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56: 8948–8952
90. Porter DW et al., *J Biochem Toxicol* 1995;10:287–292
91. Porter DW et al., *J Biochem Toxicol* 1996; 11:45–50
92. Kobosokova E.N. et al., *Biochemistry (Moscow)*, 2016;81(3):187-200
93. Harper S et al., *Methods Mol Biol.* 2011 ; 681: 259–280.
94. Karcher SJ et al., *Expression Vectors Used in Project-Oriented Teaching Laboratories*, Chapter 1, 1995
95. BL21-codon plus, *Instruction Manual*, Agilent Technologies
96. *Competent Cells-protocols*, Stratagene
97. BL21-codon plus Cells *Correct Expression Problems caused by Codon Bias*, Stratagene
98. Urh M. et al., *Affinity Chromatography: General Methods*, Chapter 26, *Methods in Enzymology* 2009;463:418-438
99. Broenkow W et al., *Spectrophotometric determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters*, 1969
100. Kaplan A. et al., *Κλινική Χημεία, Δοκιμασίες και Τεχνικές*, 2003, (Επιμέλεια-Μετάφραση:Α.Καλοφούτης)

101. Zhao J et al., Journal of Peking University, Health Sciences 2007; 39(5):449-452
102. Braswell E., J. Phys. Chem. 1968;72:2477–2481
103. Zhao Z. et al., J. Chemometrics 1999;13:83–94
104. Smith L. et al., Effect of Hydrogen Sulfide on fish and invertebrates, Part I, 1976
105. Rajalingam D et al., PROTEIN SCIENCE 2009;18:980—993
106. Xia M et al., J Pharmacol Exp Ther. 2009;329(3):1056-62
107. Segel I, Biochemical Calculations, 1976
108. Lehninger, Nelson D, Cox M., Principles of Biochemistry
109. Α. Δημόπουλος, Βασική Βιοχημεία
110. Hacker M, et al., Pharmacology, Principles and Practice, 2008,p.300-310
111. Rosenbaum S, Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, 2017
112. Cha S., Biochem Pharmacol. 1975;24(23):2177-85
113. Kuzmic P. et al., Anal Biochem.;286(1):45-50
114. Nagahara N. et al., J Biol Chem. 1995; 270(27)
115. Wlodek L. et al., Acta Biochimica Polonica, 1982;29(1-2)
116. Williams RA et al., J Biol Chem. 2003;278(3):1480–1486
117. Nakamura T et al., Eur. J. Biochem. 2000;267: 5621±5630
118. Nagahara N. et al., J Biol Chem 1996; 271(44): 27395–27401
119. Kuo M. et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2016;310: H71–H79
120. Cherney M et al., J. Struct. Biol. 178, 319–328 (2012)
121. Ν. Πουλή, Π. Μαράκος, Φαρμακευτική Χημεία ΙΙ, ΕΚΠΑ, 2013
122. Cheland W.W., Biochemistry 1964;3(4):480-482
123. Charrier J et al., Atmos Chem Phys. 2012; 12(5): 11317–11350