

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Matemaattisluonnontieteellinen tdk.		Laitos – Institution Farmasian laitos	
Tekijä – Författare Vitie Oili Marjaana			
Työn nimi – Arbetets titel Solulimakalvostoon sitoutuneen katekoli-O-metyylitransferaasin (MB-COMT:n) katalysoiman metylaation kineettisten parametrien määrittäminen erilaisille katekolirakenteisille yhdisteille			
Oppiaine – Läroämne Farmaseuttinen kemia			
Työn laji – Arbetets art pro gradu	Aika – Datum 30.8.2000	Sivumäärä – Sidoantal 38	
Tiivistelmä – Referat <p>Katekoli-O-metyylitransferaasin (COMT) katalysoima metylaatio kuuluu Faasi II metaboliareaktioihin eli konjugaatioreaktioihin. COMT katalysoi metyyliryhmän siirtymistä koentsyymi S-adenosyyli-L-metioniiniltä (AdoMet) yhteen katekolin hydroksyyli-ryhmään. Reaktioon vaaditaan <math>Mg^{2+}</math> -ioneja ja tuotteena syntyy O-metyloitu katekoli sekä S-adenosyyli-L-homokysteini. COMT-entsyymiä löytyy eläimistä, kasveista ja prokaryoteista. Nisäkkäissä suurimmat COMT-aktiivisuudet on löydetty maksasta ja munuaisista, mutta entsyymi on yleinen kaikissa nisäkkään kudoksissa. COMT:a on olemassa kahta eri muotoa eli liukoinen (S-COMT) ja solulimakalvostoon sitoutunut muoto (MB-COMT). MB-COMT:lla ja S-COMT:lla on sama sekvenssijärjestys ja oletetaan, että avaruusrakenne aktiivisessa kohdassa on sama. Muodot erottaa MB-COMT:n aminopäässä sijaitseva pidennys, jolla entsyymi ankkuroituu solulimakalvostoon. Löytyy todisteita, että MB-COMT on vallitseva muoto neurotransmittereiden metyloinnissa fysiologisilla pitoisuuksilla ihmisen aivoissa ja mahdollisesti muissakin kudoksissa. Lääketieteessä COMT-inhibiittoreita (entakaponi ja tolkaponi) käytetään Parkinsonin taudin hoidossa.</p> <p>Erikoistyössä ihmisen geeniteknisesti tuotettua katekoli-O-metyylitransferaasin solulimakalvostoon sitoutunutta muotoa, MB-COMT:a, käyttäen määritettiin entsyymikineettiset parametrit (<math>V_{max}</math> ja <math>K_m</math>) tietylle katekolivalikoimalle. Katekolivalikoima sisälsi fysiologisesti tärkeitä neurotransmittereitä, katekolirakenteisia lääkkeitä sekä katekolyhdisteitä, jotka sisälsivät steerisiltä ja elektronisilta ominaisuuksiltaan erilaisia substituentteja. Inkuboinnissa (+ 37 °C) inkubaatioaika, entsyymikonsentraatio sekä kofaktorin AdoMetin konsentraatio pidettiin vakioina ja substraatin alkukonsentraatioita muuteltiin. Muodostuneet metylaatiotuotteet erotettiin HPLC-menetelmällä, C-18-kolonissa, kun ajoliuoksena oli fosfaatti/sitraatti-puskurin pH 3,2 ja metanolin seos. Osalle metylaatiotuotteista ajoliuokseen lisättiin myös 1-oktaanisulfonihappoa ioniparin muodostamisen vuoksi. Metylaatiotuotteiden kvantitoinnissa käytettiin hyväksi AdoMetin metyyliryhmässä olevaa <math>^{14}C</math>-leimaa, joka siirtyi reaktiossa katekolille, ja jonka pitoisuus määritettiin radioaktiivisuus-detektorilla. Detektorin mittaussyksikkönä käytettiin joko tuikenestekemnoa tai <math>CaF_2</math>-kidekemnoa tutkittavan yhdisteen mukaan. Muodostuneen tuotteen konsentraatio laskettiin AdoMetin konsentraation avulla, kun tuotteen piikin pinta-alaa verrattiin reagoimattoman AdoMetin piikin pinta-alaan. Saaduista tuotekonsentraatioista laskettiin edelleen reaktio-nopeudet, jotka sovitettiin Michaelis-Menten yhtälöön. Näin saatujen entsyymikineettisten parametrien avulla katekolien ominaisuuksia MB-COMT:n substraatteina verrattiin keskenään ja suhteessa liukoiseen COMT:iin (S-COMT), jolle entsyymikineettiset parametrit oli jo aiemmin määritetty samalla katekolivalikoimalla. Tuloksista on nähtävissä, että substraatin elektroneja puoleensa vetävä ominaisuus, hydrofobisuus sekä jäykkä litteä rakenne lisäävät affiniteettia entsyymiin. Erikoistyön tuloksia voidaan hyödyntää katekolien konjugoitumista ennustavien mallien laatimisessa.</p>			
Avainsanat - Nyckelord Katekoli-O-metyylitransferaasi, MB-COMT, entsyymikineettiset parametrit			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Farmasian laitos, Farmaseuttisen kemian osasto, käsikirjasto			
Muuta tietoa Erikoistyö kuuluu osana EU-rahoitteeseen projektiin "Development and prevalidation of predictive models for catechol drug conjugation and their evaluation for rational drug design"			