



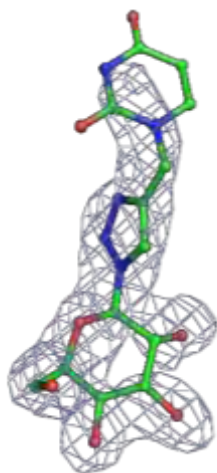
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας «Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

Κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης ενός νέου γλυκοπυρανοζιλικού αναλόγου στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου



ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΑΚΟΣ

Λάρισα, Ιούλιος 2012

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δρ. Κοντού Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δρ. Ζωγράφος Σπυρίδων

Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Στη μνήμη του πατέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος - Ιούνιος 2012, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή Δημήτριο Δ. Λεωνίδα για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την αμέριστη εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Επ. Καθηγήτρια Μαρία Κοντού και τον Δρ. Σπύρο Ε. Ζωγράφο για την συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, η οποία ανεξάρτητα από τις επαγγελματικές της υποχρεώσεις, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθειά της, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής & Φαρμακευτικής Χημείας για την συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή Σωκράτη Τζάρτο (Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών) για το ενδιαφέρον του και τις χρήσιμες συμβουλές του.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Καντσάδη για τη βοήθεια της στην κρυσταλλογραφική ανάλυση, καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Abstract	8
Περίληψη	9
Εισαγωγή	10
1. Σακχαρώδης διαβήτης	10
1.1. Γενικά	10
1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	11
1.2.1. Φυσιολογική ρύθμιση επιπέδων γλυκόζης και σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	12
1.2.2. Συμπτώματα σακχαρώδους διαβήτη τύπου II	14
1.2.3. Αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II	15
2. Βασικές γνώσεις	15
2.1. Γλυκόζη	15
2.1.1. Γενικά	16
2.1.2. Ο ρόλος της γλυκόζης	17
2.2. Γλυκογόνο	18
2.2.1. Γενικά	18
2.2.2. Σύνθεση του γλυκογόνου	19
2.2.3. Ο ρόλος τη φωσφορυλάσης	21
2.2.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης	22
2.2.5. Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης	24
2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	25
2.3.1. Γενικά	25
3. Η φωσφορυλάση γλυκογόνου	27
3.1. Κέντρα σύνδεσης της GP	31
3.2. Μηχανισμός κατάλυσης	34
4.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής	34
4.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων	36
4.2.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)	37
4.3. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών	39
4.3.1. Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης	39

4.4. Στάδια κρυστάλλωσης	41
4.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών	43
4.5.1. Διαλύτης συγκρυστάλλωσης	46
4.5.2. Παράγοντες καθίζησης	46
4.6. Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης	47
4.6.1. Γενικά.....	47
4.6.2. Βασικές αρχές.....	48
4.6.3. Ακτίνες X (Röntgen)	51
4.6.4. Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές.....	52
4.6.5. Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο.....	58
4.6.6. Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου [Dreath, 2002].....	66
4.6.7. Έλεγχος του δομικού μοντέλου.....	68
<u>Δείκτες αξιοπιστίας R</u>	68
<u>Διάγραμμα Ramachandran</u>	69

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b	71
5.1. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας	73
5.1.1. Προσδιορισμός Km της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b	77
5.2. Προσδιορισμός της IC50 αναστολέα	78
5.3. Προσδιορισμός φωσφόρου	79
5.3.1. Μέθοδος ασκορβικού οξέος	79
5.3.2. Επεξεργασία κινητικών αποτελεσμάτων	80
5.4. Κρυστάλλωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου	81
5.4.1. Σχηματισμός κρυστάλλων	82
5.4.2. Κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-11MS023	82
5.4.3. Συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων	82
5.5. Βελτιστοποίηση και ανοικοδόμηση πρωτεϊνικού μοντέλου	85

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	87
6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	88
6.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	89
6.3.1. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου	89
6.3.2. Κινητική μελέτη αναστολέα	91
6.3.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης 11MS023	92
Βιβλιογραφία	100

Abstract

Kinetic and crystallographic studies of a new glucose analogue inhibitor of glycogen phosphorylase

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Rational structure-based drug design has exploited a number of promising targets for the treatment of T2D. Hepatic glycogen phosphorylase is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle (GPb) has been employed as molecular target for the study of a new glucose analogue (11MS023) targeting the active site of the enzyme. In specific, the kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that 11MS023 inhibits the enzymatic activity of GPb with an IC_{50} value of 4.91 mM. To reveal the structural basis of inhibitor's potency, crystallographic analysis of the GPb-11MS023 complex was performed. The complex structure was determined at 2.3 Å resolution and the ligand was found bound at the active site of the enzyme forming 18 hydrogen bonds and engaging in 87 van der Waals interactions with residues at the active site of the enzyme.

Περίληψη

Κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης ενός νέου αναλόγου της γλυκοπυρανόζης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες παθήσεις και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Με στόχο τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη μοριακή δομή (ή ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων) έχει θέσει ως στόχο εξειδικευμένων μορίων, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

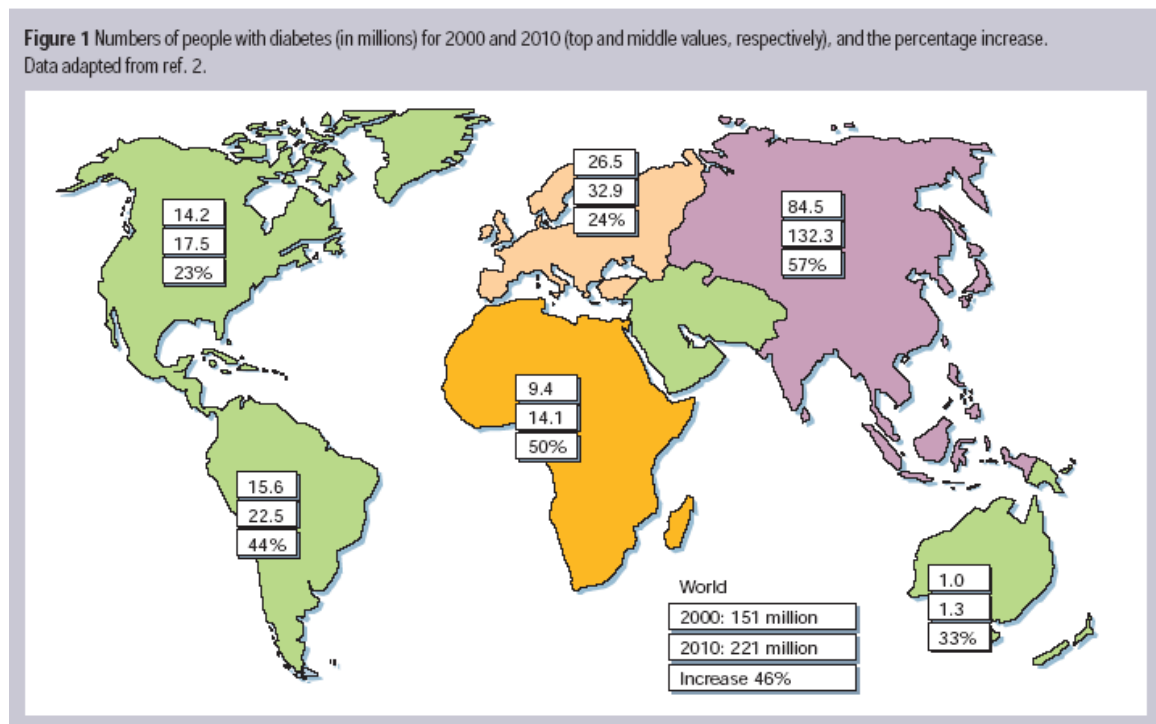
Στην παρούσα εργασία, η μυϊκή φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) χρησιμοποιείται για την κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης ενός αναλόγου γλυκοπυρανόζης (11MS023). Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι η 11MS023 αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου με σταθερά αναστολής IC_{50} 4.91 mM. Με σκοπό την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου GPb-11MS023. Η δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 2.3 Å. Ο αναστολέας βρέθηκε προσδεμένος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπου σχηματίζει 18 δεσμούς υδρογόνου και εμπλέκεται σε 87 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξικά κατάλοιπα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σακχαρώδης διαβήτης

1.1. Γενικά

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές που απασχολούν την ανθρωπότητα καθώς επηρεάζει ~5% του πληθυσμού. Σήμερα υπολογίζεται ότι 175.000.000 άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως, ενώ την επόμενη δεκαετία αναμένεται να φτάσουν τα 240.000.000. Χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη και οφείλεται στην αδυναμία του σώματος να ρυθμίσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα [Oikonomakos, 2001].



Σχήμα 1: Αριθμός ανθρώπων που πάσχουν από διαβήτη το 2000 και υπολογίζεται να πάσχουν το 2010 (οι δύο πάνω τιμές αντίστοιχα), και το ποσοστό αύξησης των πάσχοντων [Zimmet, Alberti & Shaw, 2001].

Υπάρχουν δύο κοινοί τύποι σακχαρώδους διαβήτη παγκοσμίως:

- Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων, οδηγώντας σε σχεδόν πλήρη ανεπάρκεια εκκρινόμενης ινσουλίνης. Χαρακτηρίζεται και ως «νεανικός διαβήτης» καθώς πλήττει κυρίως νεαρά άτομα.
- Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Προκαλείται από το συνδυασμό αντίστασης στην ινσουλίνη μαζί με ανεπάρκεια εκκρινόμενης ινσουλίνης.

1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό με τον οποίο αυξάνονται οι περιπτώσεις εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, θα είναι ένα από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας. Μεγαλύτερο πρόβλημα αναμένεται να αντιμετωπίσουν οι χώρες του Τρίτου κόσμου καθώς και η Κίνα και η Ινδία [Diamond, 2003].

Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με επακόλουθο την αδυναμία του σώματος να χρησιμοποιήσει το σάκχαρο σαν την κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται - σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και "μη ινσουλινοεξαρτώμενος" (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης

είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή προδιαθεσικό παράγοντα, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκα.

Table 2 Aetiological determinants and risk factors of type 2 diabetes
Genetic factors Genetic markers, family history, 'thrifty gene(s)'
Demographic characteristics Sex, age, ethnicity
Behavioural- and lifestyle-related risk factors Obesity (including distribution of obesity and duration) Physical inactivity Diet Stress 'Westernization, urbanization, modernization'
Metabolic determinants and intermediate risk categories of type 2 diabetes Impaired glucose tolerance Insulin resistance Pregnancy-related determinants (parity, gestational diabetes, diabetes in offspring of women with diabetes during pregnancy, intra-uterine mal - or overnutrition)

Σχήμα 2: Αιτιολογικοί παράγοντες του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II [Zimmet, Alberti & Shaw, 2001].

1.2.1. Φυσιολογική ρύθμιση επιπέδων γλυκόζης και σακχαρώδης διαβήτη τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτη αποτελεί μία ομάδα μεταβολικών διαταραχών των υδατανθράκων όπου η υπερπαραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ και η περιορισμένη χρήση της από τους άλλους ιστούς προκαλεί χρόνια υπεργλυκαιμία, με κύρια αιτία την προβληματική έκκριση ή/και δράση της ινσουλίνης.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα γίνεται με την δράση της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη, δύο πρωτεϊνικής φύσεως ορμόνες με αντίθετη δράση, εκκρίνονται για να διατηρήσουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ινσουλίνη, που αποτελεί «ορμόνη επάρκειας», απελευθερώνεται όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι υψηλότερα του κανονικού, με στόχο την κινητοποίηση όλων των μηχανισμών που θα έχουν ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση γλυκόζης από το αίμα. Αντίθετα, η

γλυκαγόνη απελευθερώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, με σκοπό την κινητοποίηση των μηχανισμών που θα ελευθερώσουν γλυκόζη στο αίμα.

Μετά την κατανάλωση τροφής ακολουθεί η πέψη, κατά την οποία οι τρεις κύριες κατηγορίες θρεπτικών υλών, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη, διασπώνται στα αντίστοιχα δομικά τους συστατικά για να μπορέσουν να απορροφηθούν. Οι υδατάνθρακες αποικοδομούνται προς γλυκόζη, φρουκτόζη και γαλακτόζη, οι πρωτεΐνες προς αμινοξέα και τα λίπη προς λιπαρά οξέα. Η γλυκόζη απορροφάται με ενεργητική μεταφορά (συμμεταφορά Na^+ /γλυκόζης). Η γλυκόζη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της πυλαίας φλέβας για να οδηγηθεί στο ήπαρ και μετά σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, οδηγώντας σε έκκριση ινσουλίνης, κινητοποίηση των μεταφορέων γλυκόζης του ήπατος και αποθήκευση της γλυκόζης υπό μορφή γλυκογόνου. Αφού ολοκληρωθεί η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το λεπτό έντερο, ακολουθεί μια κατάσταση στην οποία τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος μειώνονται με αποτέλεσμα τη μείωση της ινσουλίνης και αύξηση της γλυκαγόνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την κινητοποίηση του γλυκογόνου του ήπατος. Όταν έχει εξαντληθεί το γλυκογόνο του ήπατος, ξεκινά η κατάσταση «νηστείας», όπου η γλυκόζη που απελευθερώνεται από το ήπαρ αποτελεί προϊόν γλυκονεογένεσης χρησιμοποιώντας μη υδατανθρακικές πηγές (γλυκερόλη, γαλακτικό, αλανίνη κ.ά.).

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Συνεπώς, πιστεύεται ότι το πρωταρχικό πρόβλημα στο διαβήτη τύπου II είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη, και όχι η ανεπάρκειά της.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης (υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της προόδου του διαβήτη.

1.2.2. Συμπτώματα σακχαρώδους διαβήτη τύπου II

Τα συμπτώματα έρχονται σταδιακά, αλλά πολλοί άνθρωποι με διαβήτη τύπου II δεν εμφανίζουν συμπτώματα και η διάγνωση γίνεται μετά από εξετάσεις αίματος για γλυκόζη. Τα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν:

- Αίσθημα κόπωσης
- Απώλεια βάρους
- Συχνουρία
- Συνεχή δίψα
- Θολή όραση
- Φαγούρα στο δέρμα ή στην γεννητική περιοχή
- Αργή ίαση μολύνσεων
- Μούδιασμα και μυρμήγκιασμα στα χέρια ή στα πόδια



Σχήμα 4: Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου II.

Οι χρόνιες επιπλοκές του διαβήτη προκαλούν τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια, ακρωτηριασμούς και αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικών επεισοδίων.

1.2.3. Αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II

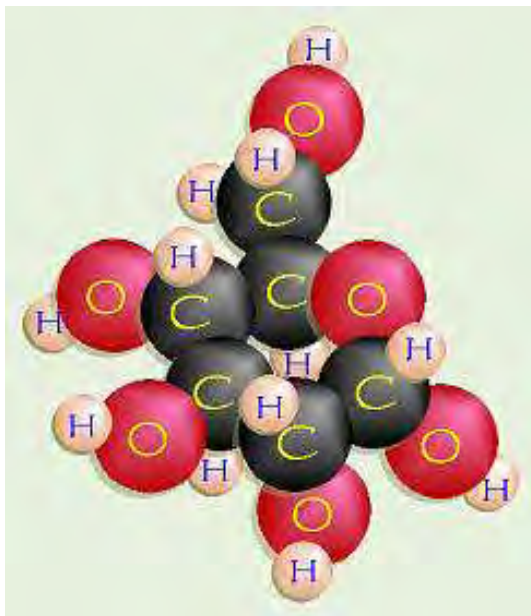
Η αδυναμία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας του μεταβολικού αυτού συνδρόμου έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, λόγω του ότι ο έλεγχος της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα δεν είναι τόσο αποτελεσματικός όσο σε φυσιολογικά άτομα. Είναι προφανές ότι υπάρχει συνεχές ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Οικονομακός *et al.*, 2001].

2. Βασικές γνώσεις

2.1. Γλυκόζη

2.1.1. Γενικά

Η γλυκόζη, η οποία ονομάζεται επίσης και δεξτρόζη ή σάκχαρο του αίματος, είναι ένας από τους κυριότερους μονοσακχαρίτες και αποτελείται από μια αλυσίδα έξι ατόμων άνθρακα συνδεδεμένων με δώδεκα άτομα υδρογόνου και έξι άτομα οξυγόνου με βάση τον χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000].



Σχήμα 5: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός απλού μορίου γλυκόζης [Stryer,1997] .

Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, αφού αποτελεί το προτιμώμενο καύσιμο για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Εάν η συγκέντρωσή της στο αίμα μειωθεί πολύ, τότε μειώνεται αντίστοιχα και η λειτουργία του εγκεφάλου [Γεωργιάτσου, 1989]. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την

συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [McArdle *et al.*, 2000].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο GP διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin *et al.*, 1998]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle *et al.*, 2000].

2.1.2. Ο ρόλος της γλυκόζης

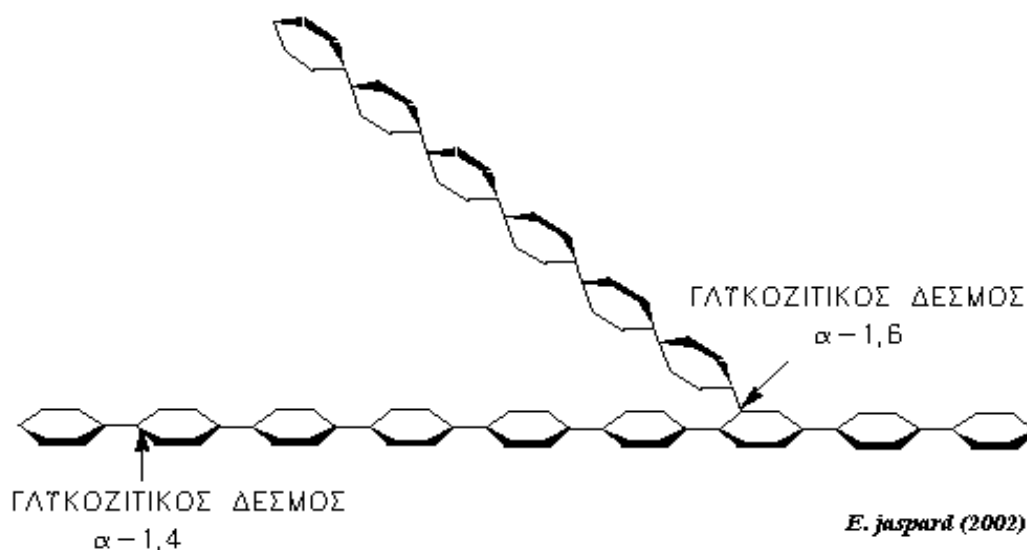
Η γλυκόζη αποτελεί τον φυσιολογικό ρυθμιστή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, εφόσον αδρανοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη [Stalmans *et al.*, 1974]. Η γλυκόζη σαν αλλοστερικός μεταβολίτης σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης α (λιγότερο δραστική), γεγονός που εκθέτει την φωσφορική ομάδα της σερίνης (Ser) 14 στην υδρολυτική δράση της φωσφατάσης (PP-1G), η οποία μετατρέπει την GPα (φωσφορυλιωμένη GP) σε GPβ (μη φωσφορυλιωμένη) [Madsen *et al.*, 1978, Sprang *et al.*, 1982]. Η μετατροπή της GPα σε GPβ συνοδεύεται από την απελευθέρωση της PP-1G, η οποία έχει πλέον την δυνατότητα να ενεργοποιήσει την συνθάση του γλυκογόνου (GS) [Bohlen *et al.*, 1992]. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από αντιδράσεις φωσφορυλίωσης- αποφωσφορυλίωσης με κύριο ρυθμιστή την γλυκόζη.

Η γλυκόζη ως αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου συναγωνιστικά με το υπόστρωμα, σταθεροποιώντας παράλληλα την T διαμόρφωση η οποία είναι λιγότερο ενεργή, δίνοντας εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με το βρόγχο της αλυσίδας 282-287 (280s), που παρεμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο [Oikonomakos *et al.*, 1987].

2.2. Γλυκογόνο

2.2.1. Γενικά

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης [Stryer, 1997].



Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση του γλυκογόνου.

Η παρουσία του γλυκογόνου αυξάνει κατά πολύ την ποσότητα της γλυκόζης που είναι άμεσα διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων και κατά την διάρκεια της έντονης μυϊκής άσκησης στον άνθρωπο. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ότι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο [Κλεισούρας, 1997].

Το γλυκογόνο υπάρχει στο κυτταροδιάλυμα σε μορφή κόκκων διαμέτρου 100-400Å, οι οποίοι περιέχουν τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση και αποικοδόμησή του καθώς και μερικά από τα ένζυμα που ρυθμίζουν αυτές τις διεργασίες. Παρ' όλα αυτά ένας κόκκος γλυκογόνου διαφέρει από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα στο

γεγονός ότι τα συνδεδεμένα ένζυμα στους κόκκους του γλυκογόνου δεν υπάρχουν σε καθορισμένες μοριακές αναλογίες. Ακόμη ένας κόκκος γλυκογόνου δομικά, είναι λιγότερο οργανωμένος από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα [Stryer, 1997].

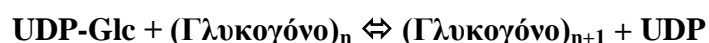
Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι δυο πάρα πολύ σημαντικές διαδικασίες γιατί:

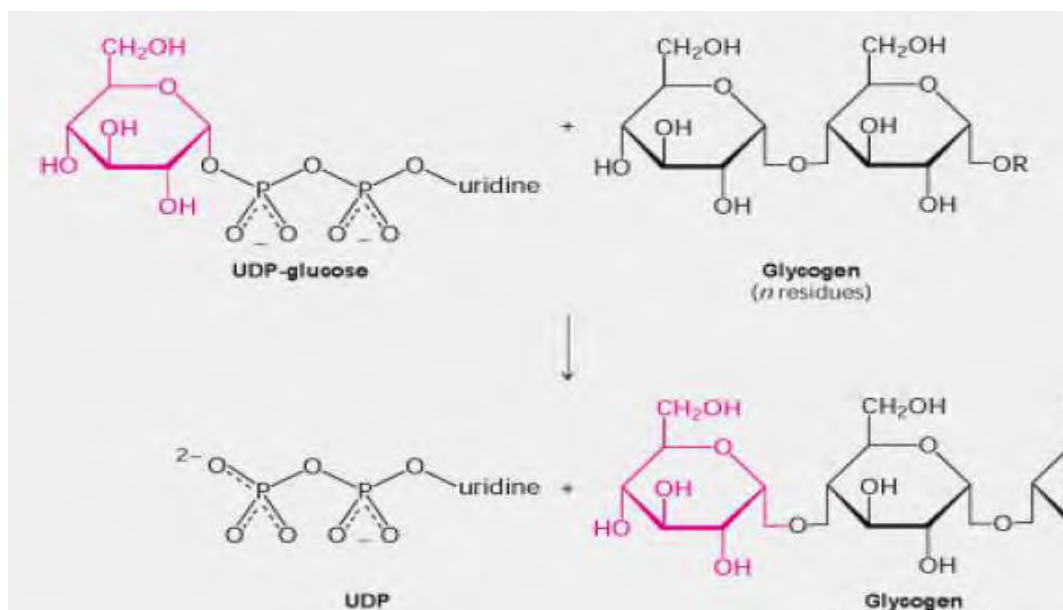
- Ρυθμίζουν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα
- Παρέχουν αποθέματα γλυκόζης στην περίπτωση κοπιαστικής εργασίας
- Συμβαίνουν με διαφορετικές μεταβολικές πορείες, γεγονός που απεικονίζει μια βασική αρχή της βιοχημείας
- Για την ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου μεσολαβούν μηχανισμοί γενικότερης σημασίας.
- Ένας μεγάλος αριθμός κληρονομούμενων ενζυμικών βλαβών, μερικές από τις οποίες είναι θανατηφόρες στην παιδική ηλικία, έχει χαρακτηριστεί ότι οφείλεται στον ελαττωματικό μεταβολισμό του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

2.2.2. Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου αποτελούν δυο διαφορετικές πορείες. Για την σύνθεση του γλυκογόνου είναι απαραίτητο ένα εναρκτήριο μόριο (τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων) πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της GS (συνθάση του γλυκογόνου). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από μια πρωτεΐνη που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο αυτό περιέχει και πρωτεΐνες [Stryer, 1997].

Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την παρακάτω πορεία:





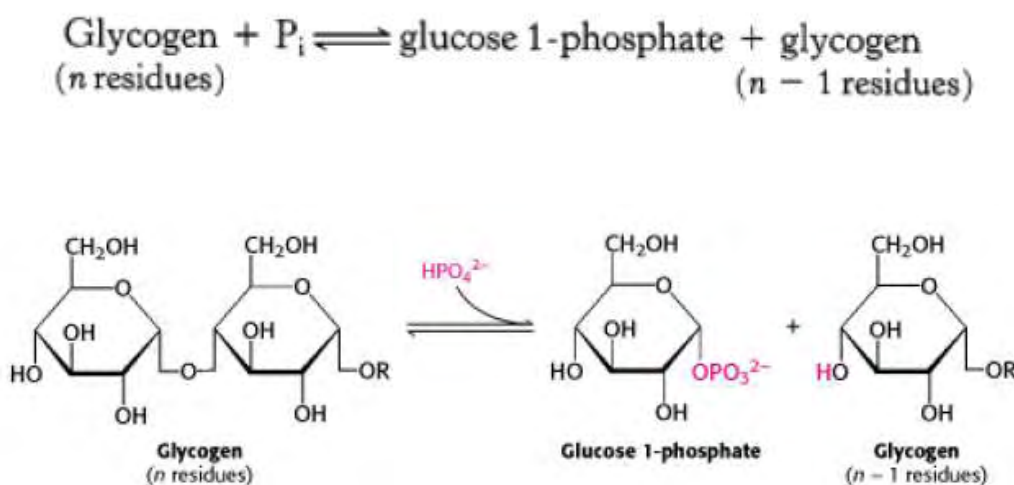
Σχήμα 7: Σύνθεση του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

Η GS μεταφέρει μόρια γλυκόζης από την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-Glc) σε μια αλυσίδα α-1,4-πολυγλυκόζης, με ελάχιστο αριθμό μορίων ίσο με 4, δημιουργώντας α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς [Stryer, 1997].

Η γλυκανο-1,6-τρανσφεράση (ένζυμο διακλάδωσης ή ένζυμο Q) αναλαμβάνει να δημιουργήσει α-1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μεταφέρει μια αλυσίδα μήκους 6-7 μονάδων γλυκόζης από τον α-1,4 δεσμό στο 6-υδροξύλιο μιας γλυκοζυλικής ομάδας που βρίσκεται κυρίως προς το εσωτερικό του μορίου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται αμέσως μια μακρύτερη διακλάδωση, την οποία η GS μπορεί να επιμηκύνει ακόμη περισσότερο. Κάθε μεταφερόμενο τμήμα πρέπει να προέρχεται από μια αλυσίδα αποτελούμενη το λιγότερο από 11 μονάδες γλυκόζης και το νέο σημείο διακλάδωσης θα πρέπει να απέχει τουλάχιστον 4 μονάδες γλυκόζης από το επόμενο. Η διακλάδωση είναι σημαντική καθώς αυξάνει τη διαλυτότητα του γλυκογόνου. Επίσης, δημιουργεί έναν μεγάλο αριθμό τελικών καταλοίπων, τα οποία είναι οι περιοχές δράσης της φωσφορυλάσης και της συνθάσης του γλυκογόνου. Συνεπώς, η διακλάδωση αυξάνει την ταχύτητα σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

2.2.3. Ο ρόλος τη φωσφορυλάσης

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936, οι οποίοι απέδειξαν πως το γλυκογόνο διασπάται σταδιακά από τα ορθοφωσφορικά ιόντα (H_2PO_4^+) προς τον σχηματισμό ενός νέου φωσφορυλιωμένου σακχάρου που πλεονεκτεί ενεργειακά με βάση την παρακάτω αντίδραση. Το νέο αυτό σάκχαρο ταυτοποιήθηκε ως η 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P ή G1P).



Σχήμα 8: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

Το ζεύγος Cori στη συνέχεια απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο όπως έχει αναφερθεί είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό ένζυμο στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936].

Η GP καταλύει την συνεχή διάσπαση και απομάκρυνση μορίων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα ενός μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

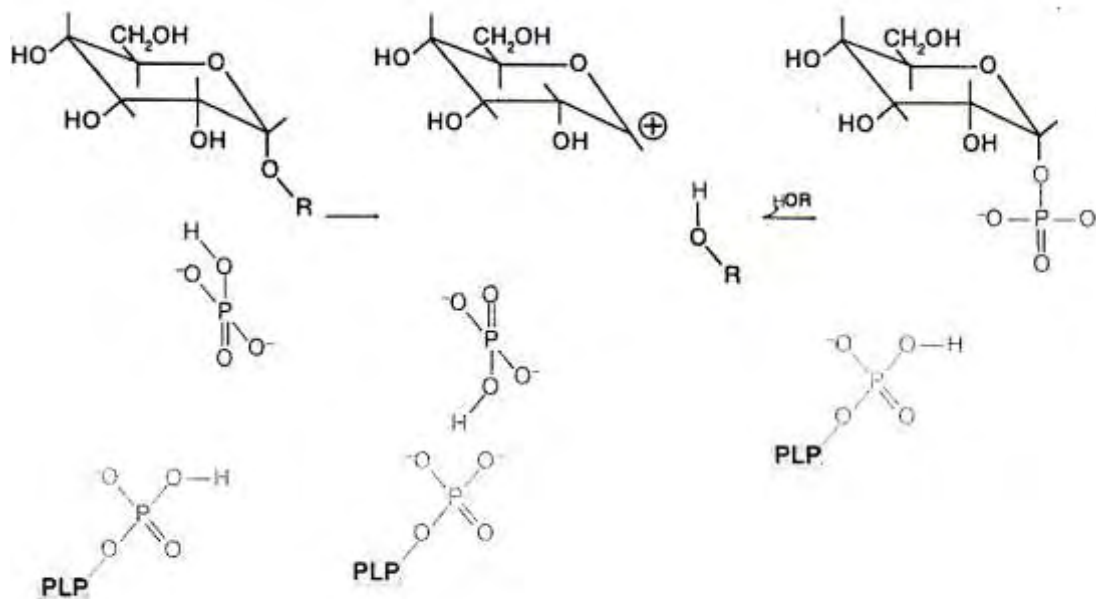
Η αντίδραση καταλύεται από τη GP και είναι αντιστρεπτή in vitro. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας του ορθοφωσφορικού προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6. Η ΔG° της αντίδρασης είναι μικρή, γιατί ένας γλυκοζιτικός δεσμός

αντικαθίσταται από έναν δεσμό φωσφορικού εστέρα, ο οποίος έχει περίπου το ίδιο δυναμικό μεταφοράς. Ωστόσο, η φωσφορόλυση προχωρεί κυρίως προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου *in vivo*, επειδή ο λόγος [Pi]/[1-φωσφορική γλυκόζη] είναι συνήθως μεγαλύτερος του 100. Επίσης, οι ορμόνες που οδηγούν σε αύξηση της δραστηριότητας της GP, πάντα προκαλούν αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Τέλος, οι ασθενείς που έχουν παντελή έλλειψη φωσφορυλάσης των μυών είναι σε θέση να συνθέτουν γλυκογόνο στους μυς [Stryer, 1997].

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

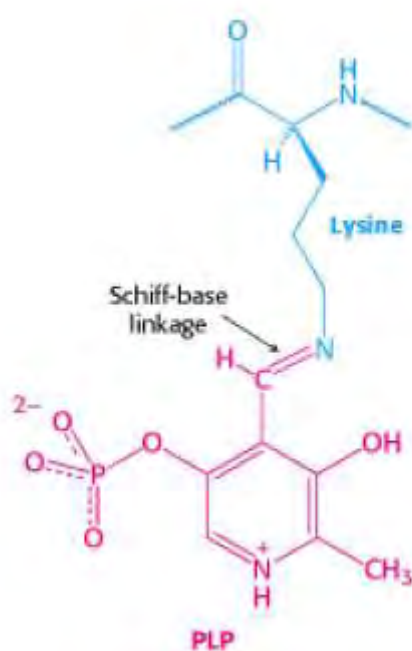
Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για b, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατίον, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].



Σχήμα 9: Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Περιθλασιγράμματα ακτίνων X και μελέτες με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων. Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α -1-φωσφορική γλυκόζη. Η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η GP είναι να διασπάσει φωσφορολυτικά το γλυκογόνο, παρά υδρολυτικά με κέρδος έναν \sim P. Αυτό

απαιτεί παντελή αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο, κάτι που δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP ως γενικού οξεοβασικού καταλύτη [Stryer, 1997].

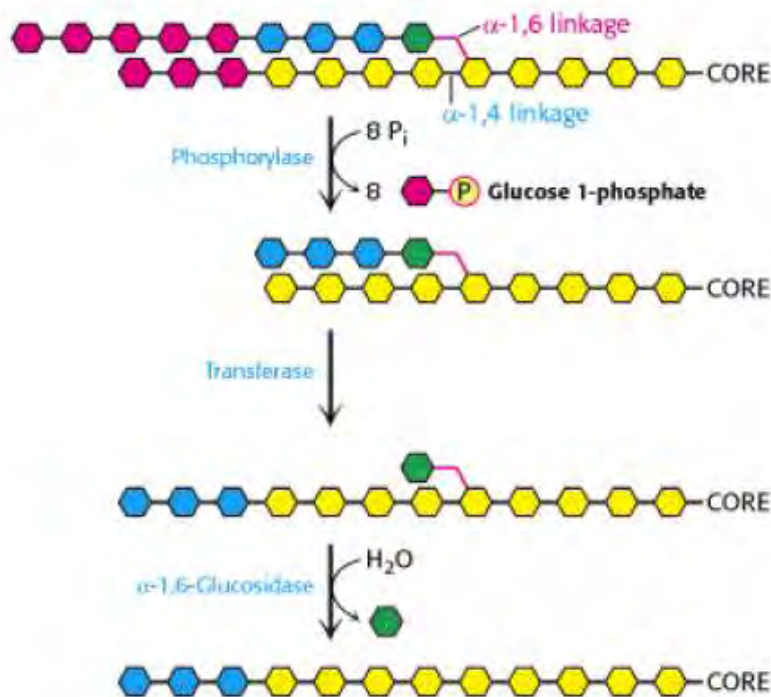


Σχήμα 10: Η φωσφορική πυριδοξάλη (κόκκινο) σχηματίζει μία βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

2.2.5. Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης

Το γλυκογόνο αποικοδομείται ως έναν ορισμένο βαθμό από τη GP και μόνο. Παρ'όλα αυτά, οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α-1,6 στα σημεία διακλάδωσης δεν διασπώνται από την GP. Πράγματι, η GP σταματά την διάσπαση δεσμών α-1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης. Η δράση της GP φαίνεται στο σχήμα 11. Το ένζυμο αυτό υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 μεταξύ των z και h [Stryer, 1997].

Η μεταφοράση (transferase) και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (γλυκοσιδάση α-1,6) (α-1,6-Glucosidase) μετατρέπουν τη διακλαδωμένη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη GP. Ένα πολύ ενδιαφέρον σημείο αποτελεί το γεγονός ότι η μεταφοράση και η α-1,6 γλυκοσιδάση αποτελούν μέρη του ίδιου ενζύμου [Stryer, 1997].



Σχήμα 11: Βήματα αποικοδόμησης του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.3.1. Γενικά

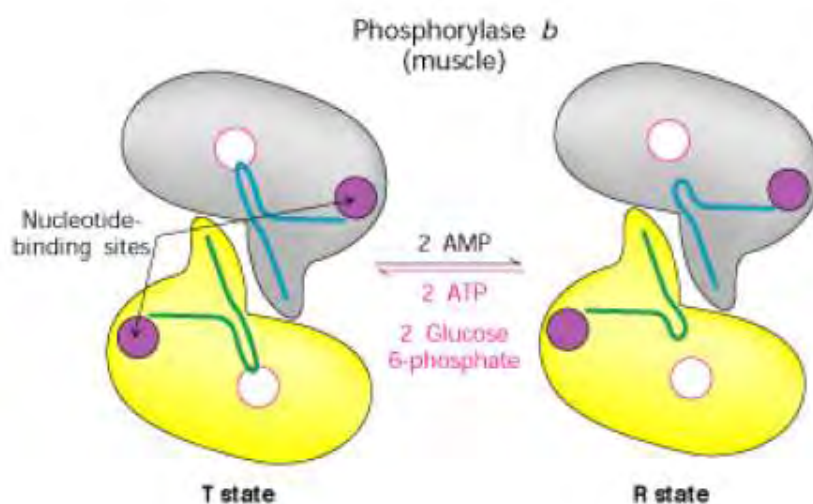
Η GP (απουσία τροποποιητών) είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα του ενζύμου [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Στον μυ σε κατάσταση ηρεμίας, η GP βρίσκεται στην ανενεργή μορφή b, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α -D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια

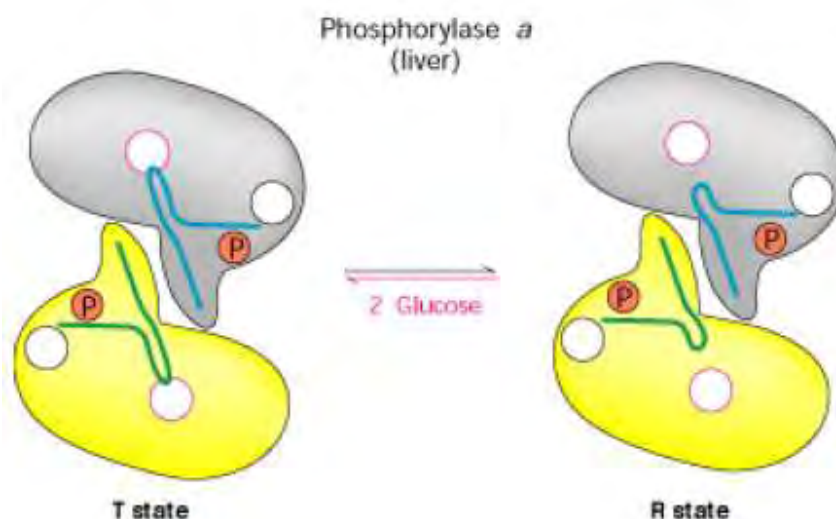
δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P [Johnson *et al.*, 1989].

α)



β)



Σχήμα 12: Αναπαράσταση του ελέγχου της δραστηριότητας α) της GPb στους μυς (muscle) και β) της GPa στο ήπαρ (liver). Στους μυς η δραστηριότητα της GP ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό αλλοστερικά από το ενεργειακό φορτίο (AMP, ATP) αλλά και από την 6-φωσφορική γλυκόζη (glucose 6-phosphate). Αντίθετα στο ήπαρ,

που βρίσκεται κυρίως υπό μορφή GPα η γλυκόζη είναι αυτή που ρυθμίζει τη δραστικότητα [Stryer,1997].

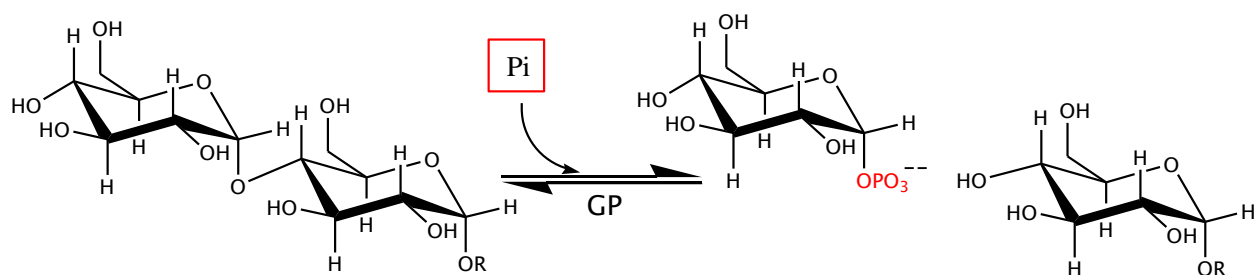
Στα θηλαστικά, τα κυριότερα ισοένζυμα της GP προέρχονται από τους μύες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο αυτά κατά προτίμηση εκφράζονται. Το cDNA, στο οποίο κωδικοποιείται ολόκληρη η αμινοξική ακολουθία της GP που προέρχεται από τις παραπάνω πηγές, έχει κλωνοποιηθεί και ταυτοποιηθεί σε αρκετά είδη. Μεταξύ της GP που προέρχεται από τον άνθρωπο και της GP που προέρχεται από τα κουνέλια παρατηρείται 97% ομολογία, ωστόσο όσον αφορά τα τρία ισοένζυμα που προέρχονται από τον άνθρωπο η ομολογία πλησιάζει το 80%. Η μυϊκή και η ηπατική GP εμφανίζουν διαφορετικές ρυθμιστικές ιδιότητες. Ο φυσιολογικός ρόλος της ηπατικής GP είναι η παροχή ικανής ποσότητας γλυκόζης για τους μη ηπατικούς ιστούς, όπως αυτούς του κεντρικού νευρικού συστήματος, ή η καταστολή της εξερχόμενης από το ήπαρ γλυκόζης, όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Ακόμη, ενώ το AMP ενεργοποιεί τη μυϊκή GPb σε ποσοστό 80% της δραστικότητας που παρατηρείται με την GPα, η ενεργοποίηση της ηπατικής GPb ανέρχεται σε ποσοστό μόλις 20% [Johnson, 1992, Henke & Sparks, 2006].

3. Η φωσφορυλάση γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (EC 2.4.1.1) καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη.:

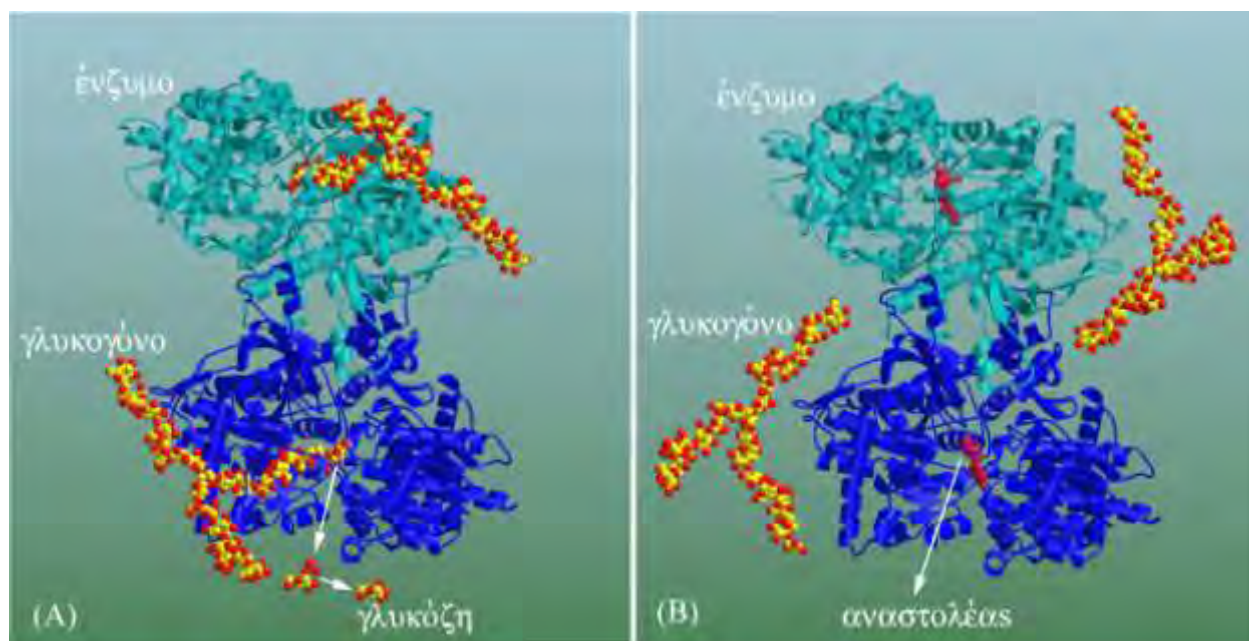


ή



Σχήμα 13. Αντίδραση της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από τη φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP). Το γλυκογόνο (πολυσακχαρίτης της γλυκόζης με α-1,4 και α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς φωσφορολύεται παρουσία ορθοφωσφορικών ιόντων (P_i) στον

α -1,4 δεσμό ελευθερώνοντας 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη. R είναι το υπόλοιπο τμήμα του γλυκογόνου.

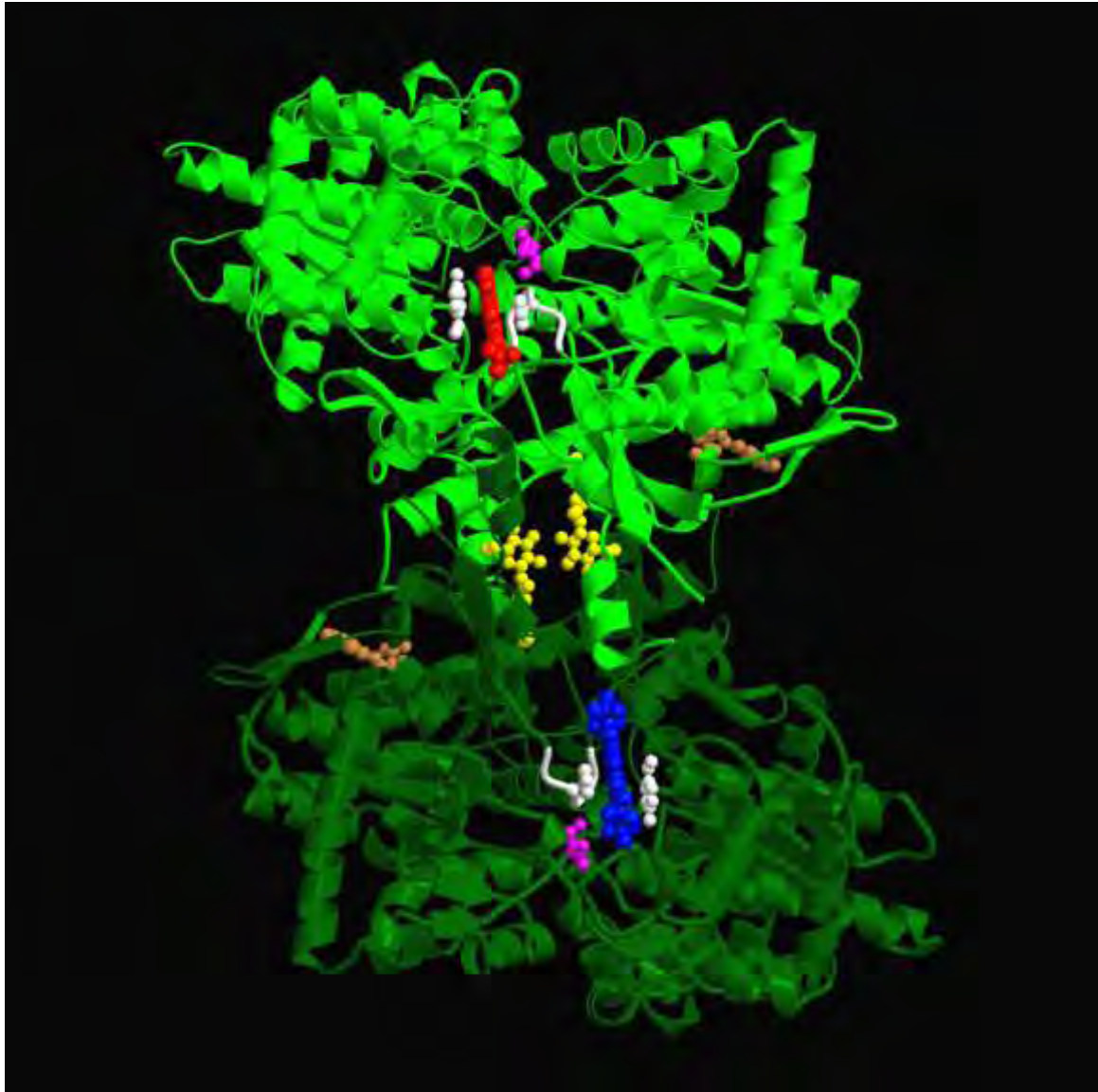


Εικόνα 1: Εικονική αναπαράσταση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου αρχικά προς μόρια 1-φωσφορική α -D-γλυκόζης και στη συνέχεια προς μόρια γλυκόζης από τη φωσφορυλάση γλυκογόνου. (A) Διάσπαση του γλυκογόνου και (B) Αναστολή της διάσπασης του γλυκογόνου. Ο αναστολέας καταλαμβάνει το καταλυτικό κέντρο, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος (Οικονομάκος, 2002).

Η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη, στο μυ, μεταβολίζεται (μέσω γλυκόλυσης) για τις ενεργειακές απαιτήσεις της μυϊκής συστολής, ενώ στο ήπαρ, μετατρέπεται (μέσω της φωσφογλυκομουτάσης και της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης) προς γλυκόζη, την κύρια πηγή ενέργειας για άλλους ιστούς και κυρίως για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Λόγω ακριβώς του κεντρικού της ρόλου στην παραγωγή γλυκόζης (μέσω γλυκογονόλυσης), έχει επιλεγεί ως στόχος σχεδιασμού φαρμάκων για την ελάττωση της συγκέντρωσης γλυκόζης, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Οικονομάκος & Somsák, 2008).

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) είναι μια κλασσική αλλοστερική πρωτεΐνη, η οποία υφίσταται σε δύο (ή τουλάχιστον δύο) τεταρτοταγείς διαμορφώσεις, T (μη ενεργός) και R (ενεργός). Η δομή της διμερούς GPb με τις 2 υπομονάδες και τα 5 αλλοστερικά κέντρα σύνδεσης φαίνεται στην Εικόνα 2. Το **καταλυτικό κέντρο** (κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος-Glc-1-P και του αναστολέα- γλυκόζης) βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Στην T-διαμόρφωση δεν

υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~ 5 Å και μήκους ~ 15 Å, αλλά περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-287 (άσπρο)). Το **κέντρο αναστολής** βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου (~ 12 Å) και απαρτίζεται από αμινοξέα με υδροφοβικά χαρακτηριστικά (Phe285 από το βρόχο 282-286 και Tyr613) (εδώ π.χ. συνδέεται η φλαβοπιριδόλη- επιστοιβάζεται μεταξύ των 2 αρωματικών αμινοξέων). Το **κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου** (μέσω του οποίου η φωσφορυλάση συνδέεται στα σωμάτια γλυκογόνου *in vivo*), βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, ~ 30 Å από το καταλυτικό και ~ 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Το **νέο αλλοστερικό κέντρο** ή κέντρο σύνδεσης indole-2-carboxamides βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και απέχει ~ 15 Å από το αλλοστερικό, ~ 33 Å από το καταλυτικό και ~ 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το **αλλοστερικό κέντρο** (κέντρο σύνδεσης του AMP), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο ~ 30 Å. Υπάρχουν λοιπόν 5 διαφορετικά κέντρα σύνδεσης, προσφέροντας έτσι πολλαπλές ευκαιρίες ρύθμισης του ενζύμου.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της δομής της φωσφορυλάσης γλυκογόνου, που αποτελεί στόχο για το σχεδιασμό αντι-υπογλυκαιμικών φαρμάκων, ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης. Η μία υπομονάδα απεικονίζεται με χρώμα ανοιχτό πράσινο και η άλλη με σκούρο πράσινο. Σημειώνονται οι θέσεις των επί μέρους κέντρων σύνδεσης του ενζύμου (καταλυτικού, αλλοστερικού, ανασταλτικού και νέου αλλοστερικού). Το καταλυτικό κέντρο, στο οποίο συνδέονται τα υποστρώματα 1-φωσφορική γλυκόζη, το γλυκογόνο και τα φωσφορικά ιόντα ή ο αναστολέας γλυκόζη (χρώμα ματζέντα) βρίσκεται στο κέντρο της κάθε υπομονάδας. Στην ανενεργό διαμόρφωση του ενζύμου (T-διαμόρφωση) η πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου, από τον περιβάλλοντα διαλύτη, προς το καταλυτικό κέντρο γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους $\sim 5 \text{ \AA}$ και μήκους περίπου $\sim 15 \text{ \AA}$, αλλά η πρόσβαση

περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-286) (χρώμα άσπρο). Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του ενεργοποιητή AMP- χρώμα καφέ ή του αναστολέα *aventis*#21), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 30 Å. Το ανασταλτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης είτε ενός παραγώγου της ινδιουβίνης (χρώμα κόκκινο) στη μια υπομονάδα είτε ενός παραγώγου του ινδικού (χρώμα μπλε) εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και σχηματίζεται από δυο αρωματικά αμινοξέα (Phe285- χρώμα άσπρο και Tyr613- χρώμα άσπρο). Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και συνδέει ενώσεις όπως τα indole-2-carboxamides και η benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl urea (χρώμα κίτρινο). Η εικόνα σχεδιάστηκε με τα προγράμματα μοριακών γραφικών MolScript (Kraulis, 1991), BobScript (Esnouf, 1997) και Raster3D (Merritt and Bacon, 1997) (Oikonomakos et al., 2006).

3.1. Κέντρα σύνδεσης της GP

Η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης

1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GP_β, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GP_α έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων [Stryer, 1997].

2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R,

της GPα και της GPβ. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [Oikonomakos *et al.*, 1992].

3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από την επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόγχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T → R, ο βρόγχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας [Oikonomakos *et al.*, 1992].

4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η

περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [Johnson *et al.*, 1989].

Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Oikonomakos *et al.*, 1992].

5. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στην ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόγχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP [Oikonomakos *et al.*, 2002].

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Sprang *et al.*, 1982].

6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουργία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

3.2. Μηχανισμός κατάλυσης

Ο μηχανισμός της κατάλυσης της GP μπορεί να περιγραφεί μέσω ενός υποστρώματος ολιγοσακχαρίτη. Εξελίσσεται μέσω μιας αντίδρασης διπλής αντικατάστασης σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η 5'-φωσφορική ομάδα του συνενζύμου PLP προάγει τη γενική, όξινη προσβολή της ανόργανης φωσφορικής ομάδας στο γλυκοζιτικό οξυγόνο. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας του συνενζύμου και του ανόργανου φωσφορικού υποστρώματος επιτρέπει την ταχεία ανταλλαγή πρωτονίων μεταξύ δύο φωσφορικών ομάδων. Η πρωτονίωση του γλυκοζιτικού οξυγόνου, μεταξύ των υπομονάδων, οδηγεί στη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού και στο σχηματισμό ιόντος καρβονίου- οξωνίου. Αυτό το μεταβατικό στάδιο ευνοείται και σταθεροποιείται από τη φορτισμένη αρνητικά φωσφορική ομάδα. Στο δεύτερο στάδιο, η ανόργανη φωσφορική ομάδα, η οποία δρα ως πυρινόφιλη, προσβάλλει το ιόν καρβονίου του άνθρακα C1, οδηγώντας στο σχηματισμό του προϊόντος G1P με ταυτόχρονη διατήρηση της διαμόρφωσης [Watson *et al.*, 1999].

4. 1. Αρχές ενζυμικής κινητικής

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το

ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V, ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S, που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P, που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{MAX} \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right)$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{MAX} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_M η σταθερά Michaelis :

$$K_M (\text{σταθερά Michaelis}) = k_1 + k_3/k_2$$

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0 = k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, $V_0 = k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} . Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η

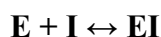
V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και για αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης).

Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η k_{CAT} , που ορίζεται ως $k_{cat}=V_{MAX}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η $k_{cat} = k_3$ όταν $[S] \gg K_M$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M ο λόγος δύο σταθερών, εκφράζεται σε $M^{-1} \text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου.

4.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (με διαπίδυση λ.χ.) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο ενεργού, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας σε αυτή την περίπτωση δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση.

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:



I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα.

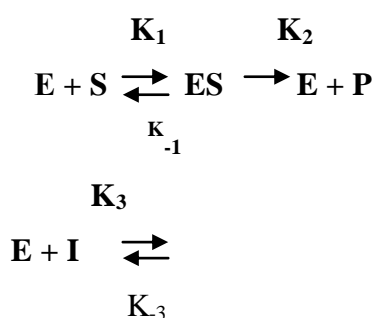
Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI ή με άλλα λόγια, η σταθερά της αμφίδρομης πιο πάνω αντίδρασης, δίνει την σχέση:

$$K_I = \frac{\{EI\}}{\{E\}\{I\}}$$

Η σταθερά Michaelis K_m αποτελεί μέτρο της αγχιστείας ή της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά K_i είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου αναστολέα.

4.2.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση στο υπόστρωμα S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα θα έχει ως εξής:



Εικόνα 3: Τρόποι δράσης αναστολέων

Από την σχέση $[E] = [E]_t - [ES]$ βλέπουμε ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου (E) είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου (E_t) μείον τη συγκέντρωση του ενζύμου που είναι δεσμευμένο με το υπόστρωμα (ES). Στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα θα αναγκαστούμε να ελαττώσουμε τη συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου και κατά το ποσό που είναι ενωμένο με τον αναστολέα I, δηλαδή

$$[E] = [E]_t - [ES] - [EI]$$

Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής :

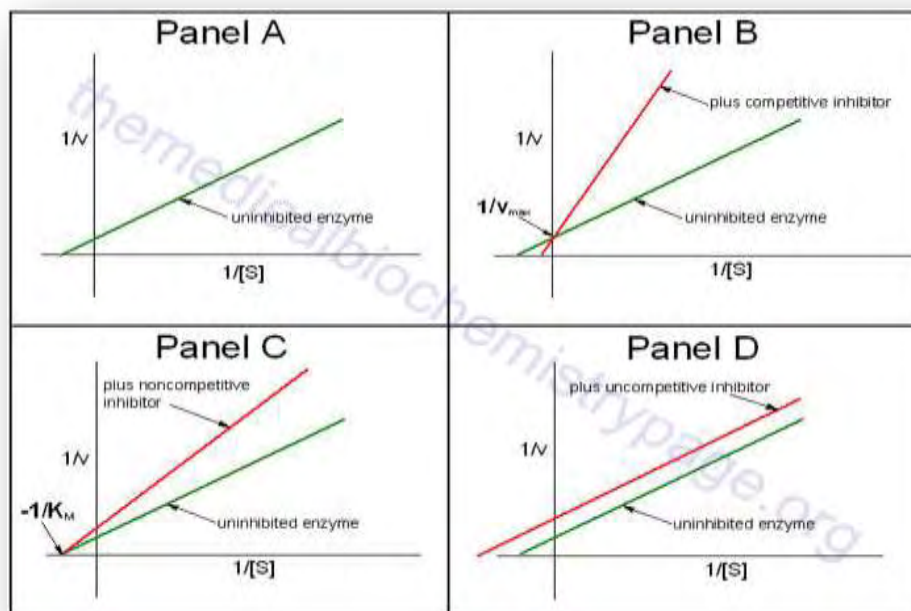
$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S]([I]K_i + 1)}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό ($[I]K_i + 1$). Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγκιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_m να είναι

φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η $[S]$ πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της $[I]$, είναι υψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ υψηλή (Ι. Γ. Γεωργιάτσος 2001).

Εκτός από την συναγωνιστική αναστολή υπάρχουν:

1. **Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.
2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές **διαστάσεως** του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS . Έτσι οι K_m και η V_{max} μεταβάλλονται.
3. **Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition)** σε αυτή την περίπτωση **αναστολής** η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος.



Εικόνα 4: Οι συναγωνιστικοί αναστολείς αυξάνουν την κλίση της καμπύλης σε ψηλότερες τιμές $1/v$ χωρίς όμως να μεταθέτουν το σημείο τομής στην τεταγμένη. Για αυτό η μεν V_{max} παραμένει σταθερή ενώ η K_m αυξάνεται.

4.3. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Μετά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της μυοσφαιρίνης από τον John Kendrew, της αιμοσφαιρίνης από τον Max Perutz τη δεκαετία του 1950 (σε ευκρίνεια 6.0 Å) και της λυσοζύμης από τον David Philips το 1965 (σε υψηλή ευκρίνεια), ο αριθμός των πρωτεϊνών που προσδιορίζονταν με περίθλαση ακτίνων X αυξήθηκε κατά μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα μέχρι σήμερα να έχουν προσδιοριστεί περίπου 8,000 δομές πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Σήμερα η περίθλαση ακτίνων X αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αλλά και άλλων μακρομοριακών συστημάτων. Σε αντίθεση με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) που γίνεται σε διάλυμα και το μέγεθος του μορίου δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερο από 30 kD, η περίθλαση ακτίνων X μπορεί να εφαρμοστεί σε κρυσταλλικά συστήματα με μοριακό βάρος μέχρι και 106 D. Ωστόσο το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία στην κρυστάλλωση των μακρομορίων.

4.3.1. Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η

ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998].

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δυο φάσεις και δίνεται από την σχέση:

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

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

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

$$\beta = c / c_s,$$

όπου c η συγκέντρωση και c_s η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα.

Στα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση, ο βαθμός υπερκορεσμού κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 10, ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος [Mikol & Giege, 1992].

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια:

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

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

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

4.4. Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό ίσως σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους [Acharya & Rees, 1997].

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. **Πυρήνωση.** Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και ορίζεται ως εξής:

$$\Delta G_g = \{-[KT(4r^3\pi)] / (V\ln\beta)\} + 4r^2\pi\gamma$$

Όπου K: η σταθερά Boltzman,

T: η απόλυτη θερμοκρασία,

r: η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου,

V: ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο,

β: ο βαθμός υπερκορεσμού και

γ: η διφασική ενέργεια διαλύματος- κρυστάλλου [Kam *et al.*, 1978].

Για να μπορέσει να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί ο κρύσταλλος, πρέπει ο βαθμός υπερκορεσμού να είναι αρκετά υψηλός έτσι ώστε το

εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων να είναι ικανοποιητικό [Mikol & Giege, 1992]. Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας πυρήνας τότε ξεκινά αυθόρμητα η ανάπτυξή του, ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν [Kam *et al.*, 1978]. Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες [Blundell & Johnson, 1976].

Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πυρήνωσης. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό της κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος [Kam *et al.*, 1978].

2. **Ανάπτυξη πυρήνων**. Μετά το στάδιο της πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με επικάθιση μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας [Kam *et al.*, 1978].

Ο ρυθμός εναπόθεσης πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται από το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας:

$$dM/ dt = D(dC/ dt)_o S$$

όπου $(dC/ dt)_o$ είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου, S είναι η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής και D ο μέσος συντελεστής διάχυσης. Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη προχωράει μέσω σύνδεσης μονομερών, η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$dM/ dt = K[C_i (0) - C_i] Sd$$

όπου $C_i (0)$ είναι η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού, C_i είναι η συγκέντρωση του διαλύματος και K ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης, ο οποίος

είναι χαρακτηριστικός της μορφολογίας του υπό ανάπτυξη κρυστάλλου [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998].

Το στάδιο της ανάπτυξης των κρυστάλλων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια της φωτομικροσκοπίας υπεριώδους ακτινοβολίας [Kam *et al.*, 1978].

3. Αναστολή της ανάπτυξης. Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης D είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης K , τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή ότι δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Με βάση διάφορα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναστολή της ανάπτυξης των κρυστάλλων δεν είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης της περιεχόμενης στο διάλυμα πρωτεΐνης. Η αναστολή της ανάπτυξης οφείλεται στη μεταβολή κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου [Kam *et al.*, 1978]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω της εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά, είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό [Blundell & Johnson, 1976].

4.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας Μεθοδολογία/τρόπος	pH Είδος παράγοντα καθίζησης Συγκέντρωση	Καθαρότητα Επίδραση προσδέτη Στάδιο σχηματισμού

προσέγγισης της ισορροπίας	παράγοντα	συσσωματωμάτων
Βαρύτητα	καθίζησης	Μετα-μεταγραφικές
Πίεση	Ιοντική ισχύς	τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση
Ηλεκτρικό / μαγνητικό πεδίο	Αναγωγικό / οξειδωτικό περιβάλλον	/υδρόλυση
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Χημική τροποποίηση
Ιξώδες (viscosity)	Μεταλλικά ιόντα	Γενετικές
Κατάσταση ισορροπίας	Σταυροδεσμοί	τροποποιήσεις
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων	Απορρυπαντικά/επιφανειο-δραστικές ουσίες/αμφολύτες	Συμμετρία
κρυστάλλωσης	Προσμίξεις	Σταθερότητα
		Ισοηλεκτρικό σημείο
		Ιστορικό δείγματος

Πίνακας 1: Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών [McPherson, 1997].

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί το σημαντικότερο αλλά και το δυσκολότερο στάδιο στην όλη κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου αριθμού των παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους και στην περιορισμένη γνώση που έχουμε για την πορεία ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος (trial-error method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. Σήμερα έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση, βελτιστοποίηση των συνθηκών αλλά και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται.

Θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας

τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας [McMurry, 2001].

pH. Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

Άλατα. Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.
2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.
3. Δρουν με διπολικές – μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.
4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου. Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο και τα γουανιδινικά άλατα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ($C \geq 4 \text{ M}$) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δράοντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς [McMurry, 2001].

Οργανικοί διαλύτες. Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται

αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες ορισμένες φορές μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [McMurry, 2001].

4.5.1. Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα οργανικά μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη. Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοιχτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς οργανωμένα και συνδέονται με τις επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα [Blundell & Johnson, 1976].

4.5.2. Παράγοντες καθίζησης

Για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η ύπαρξη κάποιων ουσιών, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες καθίζησης. Οι παράγοντες καθίζησης μπορούν να χωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

1. Άλατα (π.χ. θειϊκό αμμώνιο)
2. Οργανικοί διαλύτες (π.χ. αιθανόλη)
3. Πολυαιθυλενογλυκόλες

Εάν τοποθετήσουμε μια καθαρή πρωτεΐνη σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος τότε αυτή θα υποστεί εξαλάτωση. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι θα μειωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επειδή τα μόρια του νερού, που υπό άλλες συνθήκες θα τη διαλυτοποιούσαν, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μικρά ιόντα. Αν η συγκέντρωση των ιόντων γίνει αρκετά μεγάλη, τότε τα μακρομόρια εξουδετερώνουν τα επιφανειακά τους φορτία αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Τα δισθενή ή τρισθενή ιόντα σχηματίζουν πιο εύκολα δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και επομένως είναι περισσότερο αποτελεσματικά [McPherson, 1999].

Παρόμοια δράση με τα άλατα έχουν και οι οργανικοί διαλύτες. Τα μόριά τους ενώνονται με τα μόρια του νερού και μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των πρωτεϊνών ή την κρυστάλλωσή τους. Φυσικά, η χρήση των οργανικών διαλυτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί πολλές φορές οι διαλύτες αυτοί μπορούν να μετουσιώσουν τις πρωτεΐνες. Γι' αυτό το λόγο οι επιλογές στην χρήση του παράγοντα καθίζησης μειώνονται σημαντικά [McPherson, 1999].

4.6. Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης

4.6.1. Γενικά

Η κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων είναι μια ταχεία μέθοδος αναγνώρισης νέων εν δυνάμει φαρμάκων. Οι μέθοδοι υψηλής απόδοσης που έχουν αναπτυχθεί για την κρυσταλλογραφία ακτίνων X είναι πολύ εξελιγμένοι, ενώ οι αντίστοιχοι για την NMR τεχνική βρίσκονται ακόμη σε αρχικά στάδια [Blundell *et al.*, 2002].

Η επίδραση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι διπλή: η επιλογή και η καταλληλότητα του πρωτεϊνικού στόχου μπορεί να είναι πιο ακριβής και ο διαχωρισμός μορίων, που μπορεί να αποτελούν πρόδρομες ενώσεις, αντικαθίσταται από τον σχεδιασμό αυτών των μορίων σε πολύ πιο γρήγορη κλίμακα έτσι ώστε να συμβαδίζει με τις ανάγκες της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Γι' αυτό το λόγο η χρήση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης προκαλεί επανάσταση στη διαδικασία του σχεδιασμού νέων φαρμάκων [Blundell *et al.*, 2002].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πάρα πολλές βελτιώσεις τόσο στο μηχανολογικό κομμάτι όσο και στο λογισμικό των ηλεκτρονικών υπολογιστών με αποτέλεσμα η συλλογή δεδομένων να έχει γίνει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη. Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων εξακολουθούν να είναι δύο από τα βασικότερα στάδια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων που επιβραδύνουν την όλη διαδικασία, κυρίως γιατί το πλήθος των ενώσεων που μελετούνται είναι εξαιρετικά μεγάλο και η επανάληψη των μετρήσεων για την επικύρωση των αποτελεσμάτων είναι επιβεβλημένη. Ωστόσο η χρήση εξειδικευμένων

προγραμμαμάτων ελαχιστοποιεί την ανθρώπινη παρέμβαση και άρα αποκλείει το ανθρώπινο λάθος [Blundell *et al.*, 2002].

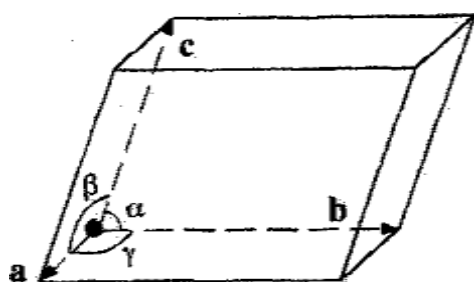
Με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης μελετάται ο τρόπος σύνδεσης και οι βασικές αλληλεπιδράσεις των ενώσεων, οι οποίες αν και εμφανίζουν μικρή συγγένεια με το μακρομοριακό στόχο, συνδέονται σ' αυτό με μεγάλη εξειδίκευση. Η έκφραση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών σε ποσότητα και μορφή που απαιτείται για την κρυστάλλωση και την ανάλυση ακτίνων Χ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνητών που ασχολούνται με τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Ο αρχικός στόχος είναι η λήψη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία θα δώσει κάποιους καλούς κρυστάλλους. Ο αντικειμενικός στόχος είναι η ανακάλυψη περιοχών οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αναδιπλώνονται και να διαλυτοποιούνται. Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να μην έχουν αλληλουχίες μικρής πολυπλοκότητας, που μπορεί να έχουν περισσότερες από μία διαμορφώσεις και να παρεμβάλλουν στη κρυστάλλωση, αλλά ούτε και μεγάλους βρόγχους, οι οποίοι καθιστούν την πρωτεΐνη μη λειτουργική και χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση [Blundell *et al.*, 2002].

Ωστόσο ακόμη και σήμερα, η ανάπτυξη κρυστάλλων καλής ποιότητας, που να μπορούν να δώσουν περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια παραμένει ένα ουσιαστικό πρόβλημα. Κάποια πρωτεϊνικά μόρια δίνουν άριστους κρυστάλλους μόνο μετά από λίγες προσπάθειες ενώ άλλα απαιτούν μερικούς μήνες και για πολλά δεν έχει γίνει δυνατή η κρυστάλλωσή τους. Η βελτίωση της ποιότητας των κρυστάλλων συμβάλλει κατά πολύ στην ακριβέστερη ανάλυση της δομής σε υψηλότερη ευκρίνεια [Acharya & Rees, 1997].

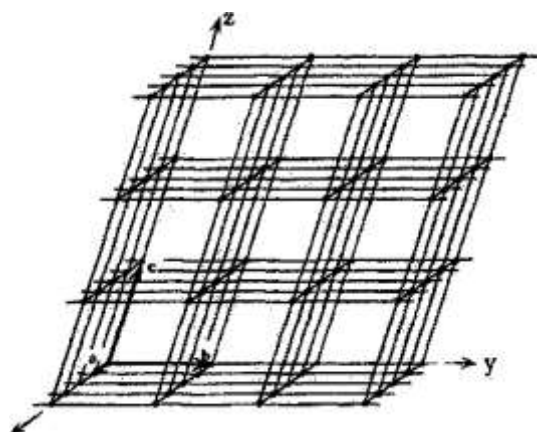
4.6.2. Βασικές αρχές

Τα στερεά σώματα διακρίνονται σε κρυσταλλικά και άμορφα. Τα κρυσταλλικά στερεά εμφανίζουν κανονικότητα στον τρόπο δόμησής τους, έτσι ώστε τα συστατικά τους (μόρια, άτομα ή ιόντα) να βρίσκονται σε καθορισμένες θέσεις και οι μεταξύ τους αποστάσεις να είναι για κάθε κρυσταλλικό στερεό σταθερές. Αντίθετα τα άμορφα στερεά δεν εμφανίζουν καμιά κανονικότητα στη δόμησή τους. Η διάκριση αυτή βασίστηκε αρχικά στα εξωτερικά γνωρίσματα των κρυστάλλων και στη διαφορετική συμπεριφορά ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (π.χ. το σημείο τήξης) [Τσαγκάρης, 1999].

Η έννοια του κρυστάλλου βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα ανεξάρτητα μόρια μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα συνδέονται και παρουσιάζουν έναν ή ελάχιστους μόνο προσανατολισμούς. Η τρισδιάστατη δομή του κρυστάλλου που προκύπτει, δημιουργείται από την επανάληψη πανομοιότυπων ομάδων, ατομικά αλλά και χωροταξικά. Η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα, η οποία αντιπροσωπεύει πλήρως την τρισδιάστατη δομή ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Το μέγεθος και η δομή της περιγράφονται από τρία διανύσματα **a**, **b** και **c** και τα οποία έχουν ένα κοινό σημείο εφαρμογής. Οι άξονες οι οποίοι σχηματίζονται από τα διανύσματα αυτά ονομάζονται κρυσταλλογραφικοί άξονες. Το σύνολο των διανυσμάτων **a**, **b** και **c** καθώς και των γωνιών **α**, **β** και **γ** που σχηματίζονται μεταξύ τους ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης ορίζεται με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα **a**, **b** και **c** [Τσαγκάρης, 1999].



Σχήμα 14: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στοιχειώδους κυψελίδας [Dreath, 2002].



Σχήμα 15: Το τρισδιάστατο κρυσταλλικό πλέγμα ως αποτέλεσμα κανονικής διάταξης της στοιχειώδους κυψελίδας [Dreath, 2002].

Αν διαιρέσουμε τον χώρο σε τρία σύνολα επιπέδων είναι δυνατόν να παραχθούν όλα τα είδη των μοναδιαίων κυψελίδων, π.χ. αν τα επίπεδα των τριών συνόλων είναι ισοδιάστατα και ταυτόχρονα κάθετα μεταξύ τους τότε η κυψελίδα που δημιουργείται είναι κύβος (κυβικό σύστημα με $a=b=c$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Αν τοποθετήσουμε σημεία στα σημεία τομής των επιπέδων αλλά και σε άλλες θέσεις έτσι ώστε όλα τα πλεγματικά σημεία να έχουν το ίδιο περιβάλλον μπορούμε να δημιουργήσουμε σημειακά πλέγματα.

Σύμφωνα με τον Γάλλο κρυσταλλογράφο Bravais (1848) μπορούμε να δημιουργήσουμε δεκατέσσερα σημειακά πλέγματα ή πλέγματα Bravais. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και τα αντίστοιχα σημειακά πλέγματα. Τα πλέγματα Bravais χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα P (primitive, θεμελιώδης ή R, ειδικά για το ρομβοεδρικό σύστημα), I (body-centered, χωροκεντρωμένη) και F (face-centered, εδροκεντρωμένη), αν υπάρχουν μόνο σημεία στα σημεία τομής των επιπέδων των κρυσταλλικών συστημάτων, αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στο κέντρο του σημειακού πλέγματος και αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στις έδρες του σημειακού πλέγματος αντίστοιχα [Παπαϊωάννου, 2004].

Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγματα Bravais	Παράδειγμα
Κυβικό	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I,F	NaCl
Τετραγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I	Zn
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I,F,C	Ρομβικό S
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c, \alpha=\gamma=90^\circ, \beta \neq 90^\circ$	P,C	Μονοκλινές S
Τρικλινές	$a \neq b \neq c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P	$K_2Cr_2O_7$
Τριγωνικό/ρομβοεδρικό	$a=b=c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	R	$CaCO_3$
Εξαγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$	P	Γραφίτης, Χαλαζίας

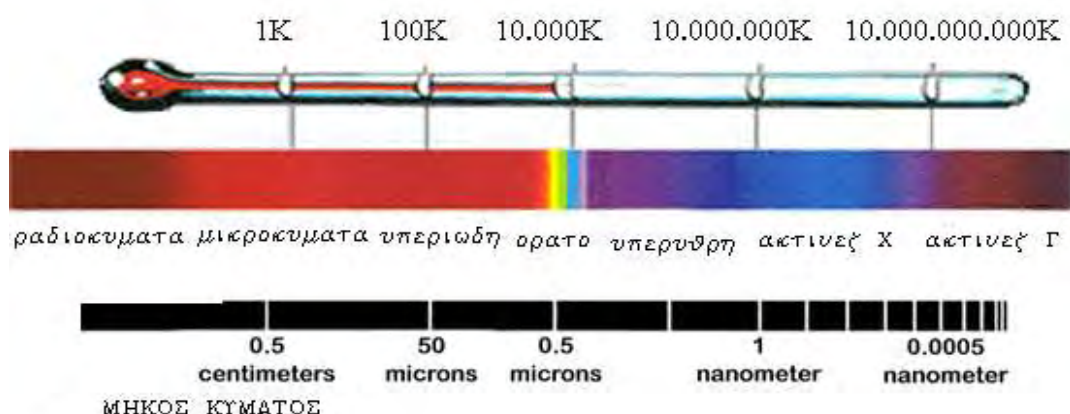
Πίνακας 2: Παρουσίαση των επτά κρυσταλλικών συστημάτων και των αντίστοιχων σημειακών πλεγμάτων (πλέγματα Bravais) [Παπαϊωάννου, 2004].

Ο συνδυασμός των δεκατεσσάρων πλεγμάτων Bravais με τις συμμετρίες σημείου (άξονες περιστροφής, επίπεδα ανάκλασης και μη-κανονικοί άξονες) και τις συμμετρίες μεταφοράς (επίπεδα ολίσθησης και άξονες ελικώσεως) παράγουν τις 230 ομάδες χώρου στις οποίες περιλαμβάνονται τόσο τα πλέγματα Bravais αλλά και η συμμετρία των πραγματικών κρυστάλλων.

4.6.3. Ακτίνες X (Röntgen)

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος $100-0.1\text{\AA}$ και ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Conrad Röntgen. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων X στα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες (XRD: X-ray Diffraction) που έχουν τη δυνατότητα να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων και να τις ταυτοποιούν [Τσαγκάρης, 1999].

Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και αποτελεί μέρος του συνολικού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.



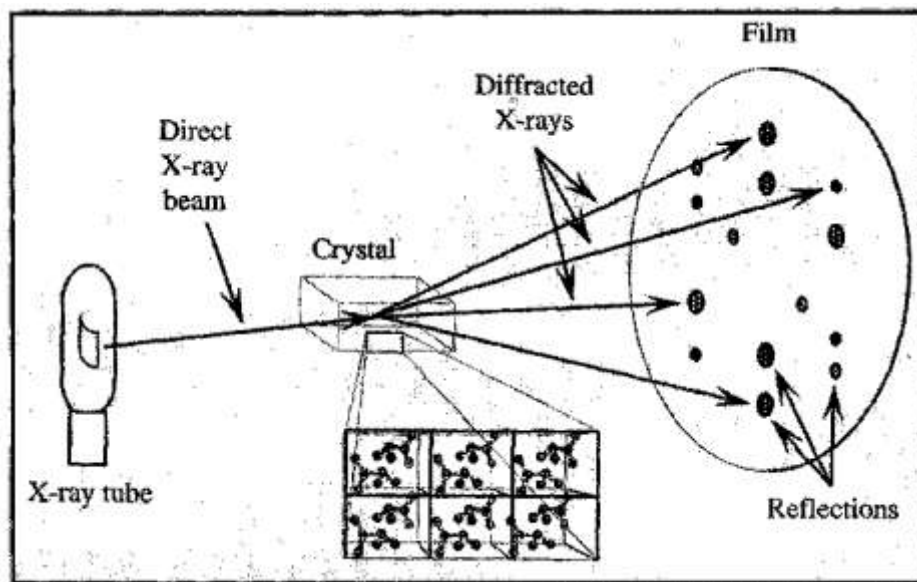
Σχήμα 16: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Ακτίνες X παράγονται όταν ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλες ταχύτητες χτυπήσουν υλικά. Τότε ένα μέρος της κινητικής τους ενέργειας μετατρέπεται σε

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της περιοχής των ακτίνων X. Το υπόλοιπο μετατρέπεται σε θερμότητα. Οι ακτίνες X ανιχνεύονται από τα αποτελέσματά τους. Έχουν ισχυρή φωτοχημική δράση που μαυρίζει τις φωτογραφικές πλάκες, προκαλούν ισχυρό φθορισμό, ιονίζουν τα αέρια και έχουν έντονη βιολογική δράση. Μπορούν να προκαλέσουν εγκαύματα και οι πολύ «σκληρές» ακτινοβολίες (μικρού μήκους κύματος) μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή στις κληρονομικές ιδιότητες προσβάλλοντας τα γονίδια των χρωμοσωμάτων του πυρήνα των κυττάρων [Τσαγκάρης, 1999].

4.6.4. Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων X απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων X. Στο σχήμα 17 παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων X.



Σχήμα 17: Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτίνες που προσπίπτουν στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα), τα ηλεκτρόνια περιθλούν ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων.

Πηγές ακτίνων X

Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια είδη πηγών, οι συμβατικές πηγές που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) και μετάπτωση ηλεκτρονίων μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) προκαλούν σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα του φωτός και να αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή κατεύθυνσης.

Στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές, οι ακτίνες X παράγονται από μια λυχνία με υψηλό κενό (περίπου 10^{-7} mmHg), η οποία περιέχει μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως χαλκός, Cu, αλλά και μολυβδαίνιο, Mo). Μια πηγή υψηλής τάσης (20-70kV) συνδέει την άνοδο με την κάθοδο ενώ το θετικό δυναμικό της πηγής συνδέεται με την άνοδο. Η άνοδος ψύχεται διότι η υψηλή τάση θερμαίνει γρήγορα το μεταλλικό έλασμα. Ο συνηθέστερος τρόπος ψύξης της ανόδου είναι με τη χρησιμοποίηση νερού ενώ αποτελεσματική ψύξη πραγματοποιείται και με τη χρησιμοποίηση περιστρεφόμενης ανόδου, όπου το μέταλλο περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφεύγεται η άνοδος της θερμοκρασίας σ' ένα μόνο σημείο [Τσαγκάρης, 1999].

Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργειες της τάξης των 10^5 eV ($1\text{eV} = 1.6 \times 10^{-19}$ Joule) ικανές να παράγουν ακτίνες X στην άνοδο [Τσαγκάρης, 1999].

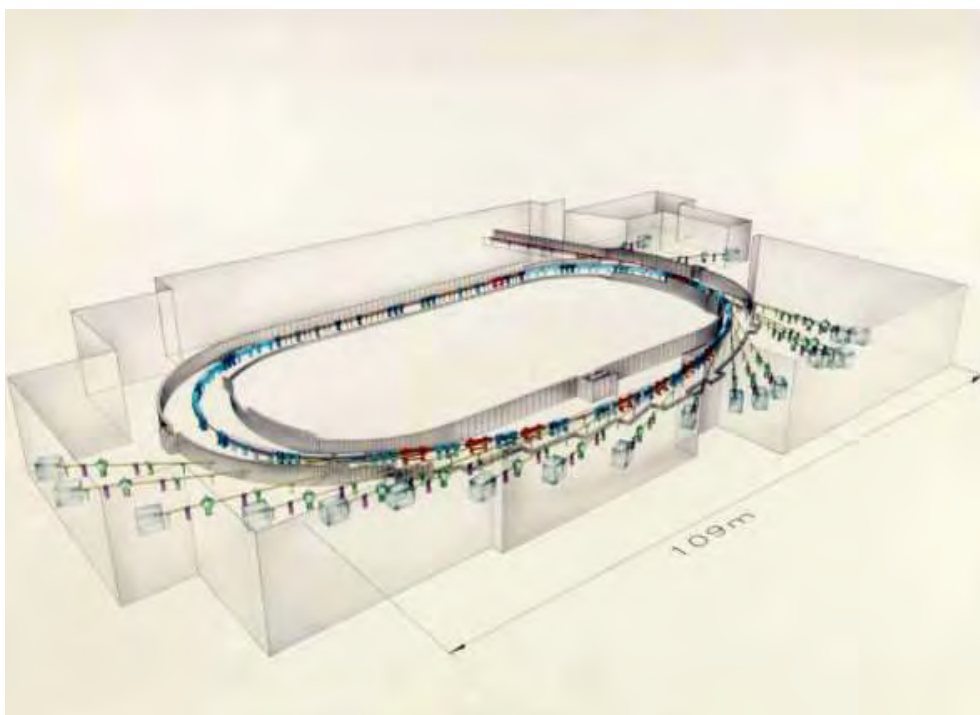
Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος.

Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα.

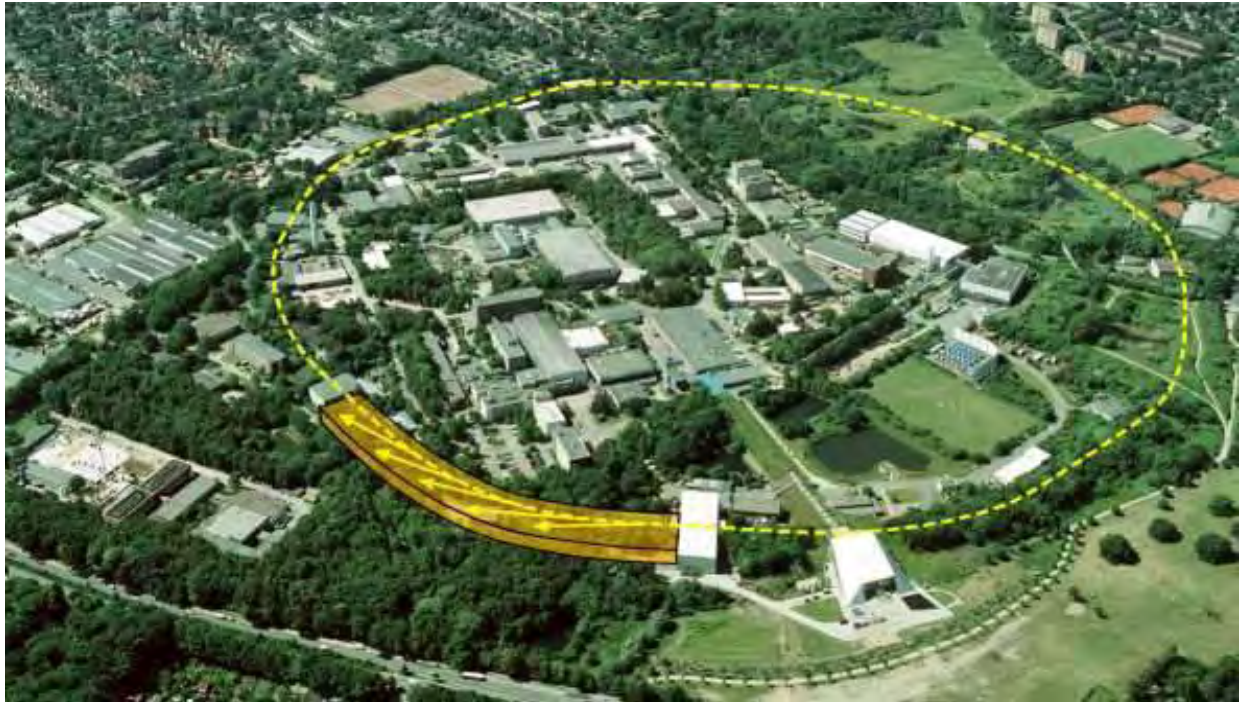
Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές (sharp).

Μία άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η ρύθμιση του μήκους κύματος (tunability). Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων X μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες X μήκους κύματος 1Å ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [Rhodes, 1993].

Ο χρόνος ζωής των σωματιδίων στο δακτύλιο αποθήκευσης είναι περιορισμένος και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (τη χρήση, το είδος των σωματιδίων κ.ά.). Όταν η ένταση της ακτινοβολίας φτάσει σε κάποιο ελάχιστο όριο γίνεται καινούργια ελευθέρωση σωματιδίων.



Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο σταθμό EMBL- outstation στο Αμβούργο της Γερμανίας.



Σχήμα 19: Αεροφωτογραφία των εγκαταστάσεων EMBL- outstation στο Αμβούργο της Γερμανίας. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το μέγεθος της διάταξης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας.

Η πρόσβαση στις συγχροτρονικές ακτίνες X είναι πολύ σημαντική. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Έτσι είναι δυνατή η περίθλαση ακτίνων X από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Αυτό φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα η συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία να είναι κεφαλαιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα, απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για αρκετές ώρες ενώ σήμερα αρκούν λίγα μόλις λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, συμβάλλει πολύ σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου, όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σχέση σήματος-θορύβου. Η χρήση μικρών γωνιών επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων δεδομένων στο ίδιο φιλμ. Η νεκρή περιοχή του πλέγματος, που είναι απρόσιτη κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα, είναι αναλογικά μικρότερη απ' ό τι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος [Ζωγράφος, 2000].

Ανιχνευτές ακτίνων X [Dreath, 2002]

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων X απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ένα μεγάλο ποσοστό) των σκεδαζόμενων ακτινών. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας $1/\lambda$ (σφαίρα του Ewald, βλέπε παρακάτω), με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

1. Το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου
2. Μία συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης της κάθε περιθλώμενης ακτινοβολίας.



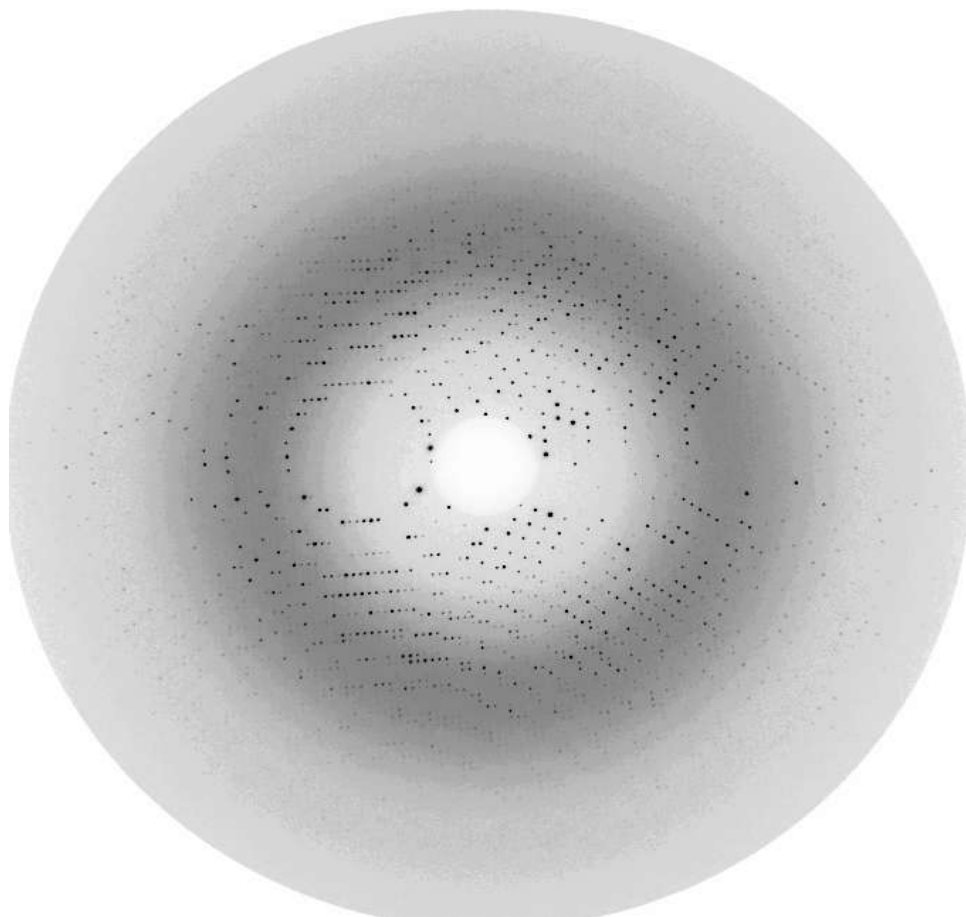
Σχήμα 20: Συσκευές κρυσταλλογραφίας ακτίνων X του εργαστηρίου Daresbury (Daresbury Laboratory, Warrington England). Αριστερά: γωνιόμετρο τοποθετημένο στη ειδική θέση.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα γίνεται με συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου.

Οι ανιχνευτές τύπου image plate είναι κατασκευασμένοι από ένα στρώμα φθορίζοντος υλικού. Τα φωτόνια των περιθλώμενων ακτίνων X προκαλούν μετάπτωση

των ηλεκτρονίων του υλικού σε υψηλότερες ενεργειακές στοιβάδες. Μέρος της ενέργειας αυτής χάνεται ως φθορισμός, ενώ μία ποσότητα ενέργειας παγιδεύεται για να ελευθερωθεί μετά από έκθεση σε laser. Συνήθως κόκκινο laser ανιχνεύει την επιφάνεια και ελευθερώνεται μπλε laser, το οποίο και μετράται με φωτοπολλαπλασιαστή. Η ένταση αυτή είναι ανάλογη των φωτονίων που αρχικά πρόσβαλλαν το υλικό. Η καταγραφή αυτή διαρκεί μερικά λεπτά ενώ η ευαισθησία είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των φωτογραφικών φιλμ.

Οι ανιχνευτές πεδιάς (area detectors) (παρόλο που το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές ανιχνεύουν περιοχή, ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση 0.1° δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους image plate ανιχνευτές που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων, πολλαπλασιαστή εικόνας (image intensifier) συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (charge coupled device).



Σχήμα 21: Παράδειγμα περιθλασιγράμματος. Το συγκεκριμένο περιθλασίγραμμα προέκυψε από περίθλαση ακτίνων X κρυστάλλου του ενζύμου φωσφορυλάση γλυκογόνου b εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

4.6.5. Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο

Περίθλαση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το φως (αλλά και οποιοδήποτε κύμα) αποκλίνει από την ευθύγραμμη πορεία του όταν συναντήσει εμπόδιο ή οπή της τάξης του μήκους κύματος των διαδομένων κυμάτων. Στην περίπτωση των ακτίνων X, όπου ο W. Röntgen ανακάλυψε ότι είναι ακτινοβολία μήκους κύματος της τάξης του 1\AA , δεν είναι δυνατό να δημιουργήσουμε φράγμα με τόσο μικρό εύρος για να μελετήσουμε την περίθλασή τους. Το 1913 ο Max von Laue διατύπωσε την ιδέα της χρησιμοποίησης του κρυστάλλου ως φράγμα για τη μελέτη της περίθλασης των ακτίνων X. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά, ο Laue όχι μόνο απόδειξε την ορθότητα της ιδέας του αλλά προκάλεσε και την αρχή του προσδιορισμού της

κρυσταλλικής δομής με την χρήση των ακτίνων X, λόγος για τον οποίο και βραβεύτηκε με το Nobel φυσικής το 1914 .

- Σκέδαση ακτίνων X από σύστημα δυο ηλεκτρονίων [Rossman & Arnold, 2001]

Η σκέδαση αποτελεί το φαινόμενο αλληλεπίδρασης των ακτίνων X, ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, με τα ηλεκτρόνια. Όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα επιδρά σε ένα σύστημα ηλεκτρονίων, η ηλεκτρική και μαγνητική συνιστώσα του κύματος ασκούν δύναμη στα ηλεκτρόνια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δόνηση των ηλεκτρονίων και την εκπομπή ακτινοβολίας του ίδιου μήκους κύματος με το αρχικό. Σύμφωνα με την ηλεκτρομαγνητική θεωρία που αναπτύχθηκε από τον J.J. Tomson η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία 2θ ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ορίζεται ίση με:

$$I_{2\theta} = I_0 \cdot (n \cdot e^4 / 2r^2 \cdot m^2 \cdot c^4) \cdot (1 + \cos^2 2\theta) \quad (1.1)$$

I_0 =ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας, n =αριθμός σκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, r =απόσταση παρατηρητή από το ηλεκτρόνιο, e =φορτίο ηλεκτρονίου, m =μάζα ηλεκτρονίου c =ταχύτητα φωτός, όπου η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της μάζας του σωματιδίου, με συνέπεια το πρωτόνιο (με μάζα 2000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ηλεκτρονίου) να σκεδάζει ασήμαντα και να μη θεωρείται σκεδαστής ακτινοβολίας.

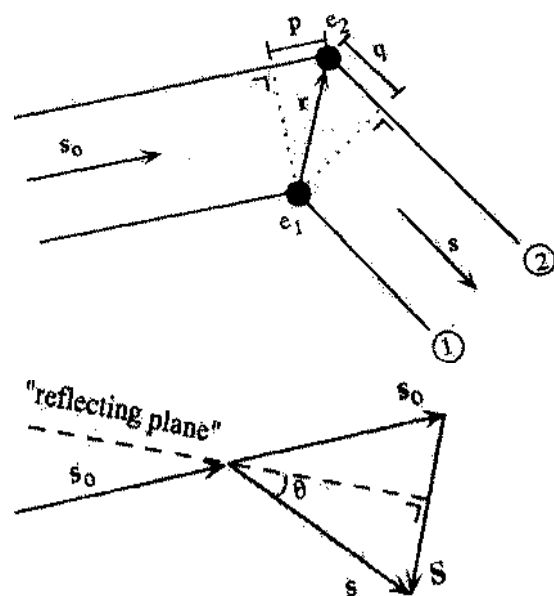
Έστω σύστημα δυο ηλεκτρονίων (e_1 και e_2) που βρίσκονται σε απόσταση r (βλ. Σχήμα 22 α). Η ηλεκτρομαγνητική προσπίπτουσα ακτινοβολία s_0 έχει μήκος κύματος λ και προσπίπτει στο σύστημα. Τα ηλεκτρόνια υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος προς κάθε κατεύθυνση (στο Σχήμα 22 απεικονίζεται μόνο η ανακλώμενη ακτινοβολία s). Η διαδρομή που ακολουθεί η ακτινοβολία που προσπίπτει στο e_2 είναι μεγαλύτερη κατά το άθροισμα των p και q αποστάσεων. Όμως, τα s_0 και s είναι διανύσματα με μήκος κύματος λ , και η διαδρομή $p = \lambda \cdot r \cdot s_0$ και $q = -\lambda \cdot r \cdot s$. Η διαφορά διαδρομής των σκεδαζόμενων ακτινοβολιών (κύμα 1 και 2) είναι ίση με $p+q = \lambda \cdot r \cdot (s - s_0)$. Το κύμα 2 που σκεδάζεται από το e_2 έχει διαφορά φάσης (ακτίνια) σε σχέση με το κύμα 1 ίση με:

$$- [2\pi \cdot (s - s_0) \cdot \lambda] / \lambda = 2\pi \cdot S, \text{ όπου } S = s - s_0 \text{ (διάνυσμα σκέδασης)} \quad (1.2)$$

Δεδομένου ότι οι σκεδαζόμενες ακτινοβολίες έχουν τα ίδια μέτρα, ίσα με $1/\lambda$ ($|s|, |s_0|$),

τότε γεωμετρικώς ισχύει ότι, $|S|=|s-s_0|=2 \cdot \sin\theta/\lambda$ (1.3),

όπου θ η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων s, s_0 και του νοητού επιπέδου κάθετου στο διάνυσμα S και καλείται επίπεδο ανάκλασης (βλ. Σχήμα 22 β).



α)

β)

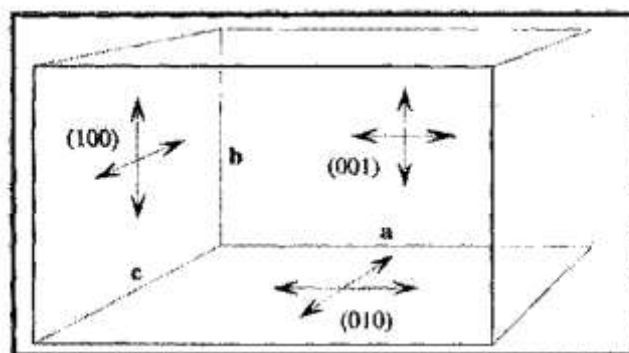
Σχήμα 22: α) Σύστημα σκέδασης από δυο ηλεκτρόνια και β) διάνυσμα σκέδασης S κάθετο στο επίπεδο ανάκλασης (reflecting plane) [Dreath, 2002]

- Συνθήκες περίθλασης - Ο νόμος του Bragg [Rhodes]

Ο W.L. Bragg σε μια προσπάθειά του να ερμηνεύσει τα φαινόμενα περίθλασης ακτίνων X υπέθεσε ότι τα προσπίπτοντα κύματα ανακλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα που σχηματίζουν τα άτομα που αποτελούν τον κρύσταλλο (γι' αυτό και οι περιθλώμενες ακτινοβολίες καλούνται και ανακλάσεις).

Όπως έχουμε αναφέρει ήδη οι στοιχειώδεις κυψελίδες σχηματίζονται από τρία ζεύγη επιπέδων. Τα επίπεδα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν από τρεις δείκτες h, k και l (γνωστοί και ως δείκτες Miller, από το όνομα του κρυσταλλογράφου Miller που εισήγαγε το σύστημα αυτό). Γενικά, κάθε επίπεδο μπορεί να περιγραφεί από τις συντεταγμένες των σημείων τομής τους με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες a, b και

c, οι οποίες και αποτελούν πολλαπλάσια των a, b και c με ακέραιους ή κλασματικούς αριθμούς. Όταν το επίπεδο είναι παράλληλο με τον κρυσταλλογραφικό άξονα τότε το σημείο τομής είναι το άπειρο. Προς αποφυγή αυτού, ο Miller εισήγαγε τους αντίστροφους αριθμούς των συντεταγμένων τομής. Αν π.χ. οι δείκτες Miller επιπέδου είναι h, k και l, τότε οι συντεταγμένες των σημείων αυτού με τους άξονες a, b και c είναι 1/h, 1/k και 1/l, και οι αντίστοιχες αποστάσεις από τους άξονες είναι a/h, b/k και c/l. Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται μια ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα και οι δείκτες Miller των κύριων επιπέδων που την σχηματίζουν.



Σχήμα 23: Ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) και δείκτες Miller των επιπέδων που την ορίζουν [Rhodes].

Στο μοντέλο του Bragg για την περίθλαση των ακτίνων X (ως ανάκλαση) στα κρυσταλλογραφικά επίπεδα, οποιοδήποτε σύνολο παράλληλων κρυσταλλογραφικών επιπέδων μπορεί να αποτελέσει πηγή μιας περιθλώμενης ακτινοβολίας (δηλαδή ολόκληρο το σύνολο των παράλληλων επιπέδων δρουν σαν μοναδικός σκεδαστής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας προσδίδοντας μια ενισχυμένη ανακλώμενη ακτινοβολία).

Ο νόμος του Bragg ορίζει ότι παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα με δείκτες h, k, l και διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} παράγουν ανάκλαση, όταν ακτίνα X μήκους κύματος λ προσπίπτει στα επίπεδα υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία, όταν η γωνία θ υπακούει στην συνθήκη:

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda \quad (1.4) \quad (\text{Νόμος του Bragg})$$

$n =$ ακέριος αριθμός που καλείται και τάξη ανάκλασης

Στην πραγματικότητα ο νόμος του Bragg αναφέρεται στην ενισχυτική και

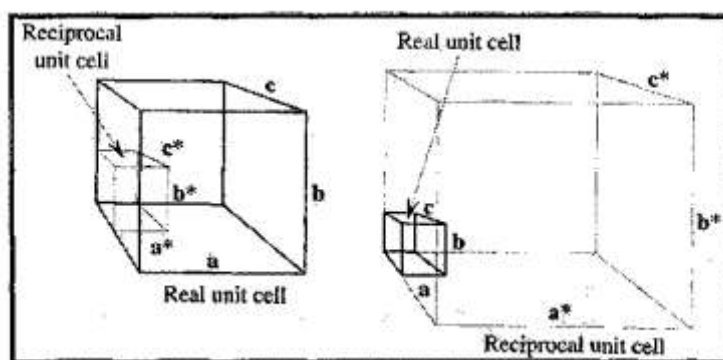
καταστρεπτική συμβολή των κυμάτων όταν πληρούν ή όχι την πιο πάνω συνθήκη, δηλ. όταν η διαφορά διαδρομής των κυμάτων είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος ή όταν η διαφορά φάσης τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π θα έχουμε ενισχυτική συμβολή.

Η διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} των επιπέδων χαρακτηρίζεται ως μέτρο της ευκρίνειας (διακριτικής ικανότητας) σε ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της διεπιφανειακής απόστασης τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η ευκρίνεια και λεπτομερέστερος ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής.

- Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του Ewald

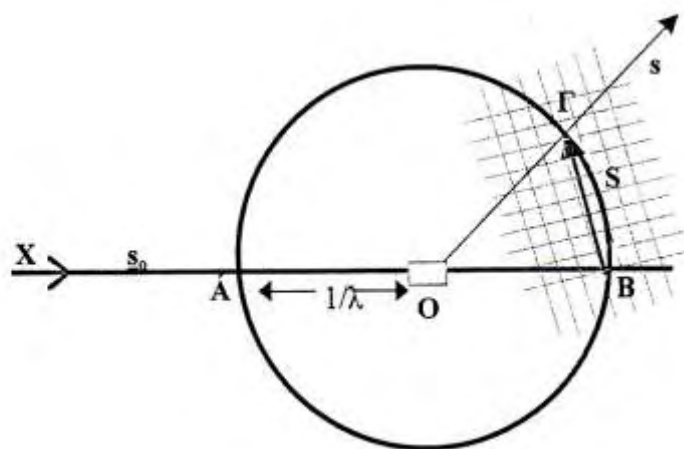
Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από κηλίδες που έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία, συμμετρία και ένταση. Η κάθε κηλίδα χαρακτηρίζεται από τρεις συντεταγμένες που δεν είναι τίποτα άλλο από τους δείκτες Miller που χρησιμοποιήσαμε για να χαρακτηρίσουμε τα παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα. Σύμφωνα με τους κρυσταλλογράφους, οι κηλίδες έχουν συντεταγμένες που ανήκουν σε ένα υποθετικό σύστημα συντεταγμένων, το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα, που βοηθά στον καθορισμό της διεύθυνσης των κυμάτων.

Το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε γεωμετρικά όπως και το πραγματικό. Στο Σχήμα 23 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μιας ανάστροφης στοιχειώδους κυψελίδας σύμφωνα με αυτά της πραγματικής.



Σχήμα 23: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ανάστροφης (reciprocal) μοναδιαίας και διαστάσεις σύμφωνα με μια μεγάλη και μια μικρή πραγματική (real) μοναδιαία κυψελίδα [Rhodes].

Το 1921, ο Edwald εισήγαγε για τη περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί σε μεγάλο ποσοστό την περιγραφή του φαινομένου. Η κατασκευή αυτή συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο, O , τον κρύσταλλο. Στο σημείο B βρίσκεται η αρχή του ανάστροφου πλέγματος όπου η προσπίπτουσα δέσμη ακτίνων XAO συναντάει τη σφαίρα. Η συνθήκη για να παριστάνει μια ακτίνα της σφαίρας OG τη διεύθυνση των περιθλώμενων ακτίνων X , ικανοποιείται εφόσον το σημείο Γ είναι σημείο του αντίστροφου πλέγματος (h,k,l) . Το διάνυσμα $B\Gamma$ σε αυτή τη περίπτωση είναι το διάνυσμα της σκέδασης S .



Σχήμα 24: Η σφαίρα του Ewald

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για την παρατήρηση μιας περίθλασης το σημείο hkl του ανάστροφου πλέγματος πρέπει να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφή του κρυστάλλου.

- Σκέδαση από ένα άτομο - Ατομικός παράγοντας σκέδασης (f)

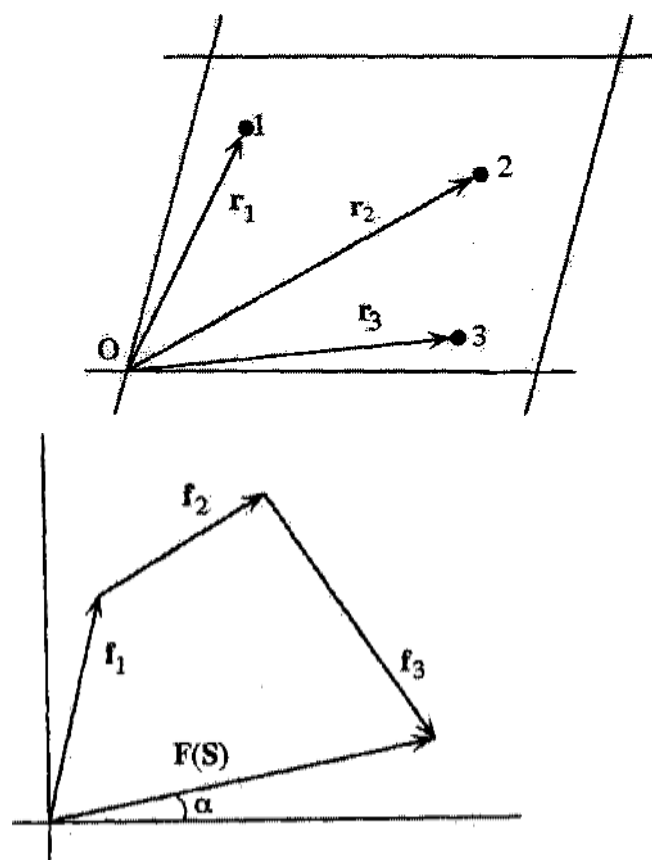
Το ηλεκτρονιακό νέφος ενός ατόμου σκεδάζει τις ακτίνες X , και η σκέδαση εξαρτάται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων και τις θέσεις τους στο νέφος. Επεκτείνοντας την θεώρηση για την σκέδαση δύο ηλεκτρονίων ορίζουμε τον ατομικό παράγοντα σκέδασης:

$$f = \int p(r) \exp[2\pi i r \cdot S] dr \quad (1.5),$$

όπου $p(r)$ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα με διάνυσμα θέσης r από τον πυρήνα. Ο ατομικός παράγοντας εξαρτάται επίσης από τον αριθμό ηλεκτρονίων κάθε ατόμου και

εκφράζει την δύναμη σκέδασης κάθε ατόμου. Επίσης, λόγω της σφαιρικής συμμετρίας του ατόμου, είναι ανεξάρτητος της διεύθυνσης του διανύσματος S αλλά εξαρτάται από το μέτρο αυτού (εξίσωση 1.3). Όταν η γωνία σκέδασης είναι μηδέν ($\theta=0$), τότε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης ισούται με τον ατομικό αριθμό Z . Καθώς η γωνία αυξάνεται θα αυξάνονται και οι διαφορές των σκεδαζόμενων κυμάτων, οπότε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης θα μειώνεται.

- Σκέδαση από μοναδιαία κυψελίδα - Δομικός παράγοντας



Σχήμα 25: Σχηματική αναπαράσταση μοναδιαίας κυψελίδας με τρία άτομα και δεξιά το διάγραμμα Argand [Dreath, 2002].

Υποθέτουμε ότι στην μοναδιαία κυψελίδα περιέχονται n άτομα (με ατομικό παράγοντα σκέδασης, f_i) σε διάνυσμα θέσης r_i ($i=1,2,3,\dots,n$) με αρχή το σημείο O (Σχήμα 25). Τα άτομα σκεδάζουν σύμφωνα με τον ατομικό παράγοντα σκέδασης, f_i και το άθροισμα των ατομικών παραγόντων μας δίνει το δομικό παράγοντα που φαίνεται στο διάγραμμα του Argand και ορίζεται από τη σχέση:

$$F(S) = \sum_{i=1}^n f_i \exp[2\pi i r_i \cdot S] \quad (1.6)$$

- Υπολογισμός ηλεκτρονικής πυκνότητας, $\rho(x, y, z)$ - Μετασχηματισμός Fourier

Το περιθλασίγραμμα αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (forward Fourier transformation) της ηλεκτρονικής πυκνότητας, και αντίστροφα, η ηλεκτρονική πυκνότητα αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (reverse Fourier transformation) του περιθλασιγράμματος.

Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας (hkl) είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του δομικού παράγοντα $F(hkl)$ και ο δομικός παράγοντας είναι συνάρτηση των ατομικών δομικών παραγόντων (εξίσωση 1.6). Επειδή η περίθλαση οφείλεται στο ηλεκτρονικό νέφος κάθε ατόμου, είναι δυνατό να εκφραστεί και ως συνάρτηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας αντί των διακριτών ηλεκτρονίων του κάθε ατόμου, οπότε

$$F(S) = \int_{\text{cell}} \rho(r) \exp[2\pi i r \cdot S] dv \quad (1.7),$$

όπου $dv = V dx dy dz$, και

$r \cdot S = (a \cdot x + b \cdot y + c \cdot z) \cdot S = a \cdot S \cdot x + b \cdot S \cdot y + c \cdot S \cdot z = h \cdot x + k \cdot y + l \cdot z$. Συνεπώς, ο $F(S)$ μπορεί να γραφεί και ως:

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i (h \cdot x + k \cdot y + l \cdot z)] dx dy dz \quad (1.8)$$

Φυσικά αυτό που χρειαζόμαστε στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X δεν είναι το περιθλασίγραμμα αλλά η ηλεκτρονική πυκνότητα. Οπότε χρησιμοποιώντας τον μετασχηματισμό Fourier, ($F = |F| \exp[i\alpha]$)

$$\rho(x, y, z) = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i (hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)] \quad (1.9)$$

Παρόλο που το μέτρο του δομικού παράγοντα μπορεί να προκύψει από τις εντάσεις $I(hkl) = |F(hkl)|^2$, οι φάσεις $\alpha(hkl)$ δεν μπορούν να προκύψουν κατευθείαν από το περιθλασίγραμμα (γνωστό ως «πρόβλημα των φάσεων») που αντιμετωπίζεται

με μια σειρά μεθόδων, άμεσων ή έμμεσων [Taylor, 2003]). Σε περίπτωση που τμήμα ενός μορίου μιας άλλης δομής υπάρχει στην υπό μελέτη δομή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο αυτό έτσι ώστε να ληφθούν οι απύσες φάσεις. Το μοντέλο στρέφεται και μεταφέρεται στον χώρο έτσι ώστε τα μέτρα των δομικών παραγόντων $|F_c(hkl)|$, να πλησιάζουν αυτά των πειραματικών $|F_o(hkl)|$. Η μέθοδος αυτή καλείται μοριακή αντικατάσταση. Μέτρο σύγκρισης της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα αποτελεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας που ορίζεται ως:

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)|)} \quad (1.10),$$

όπου ειδικά για την κρυσταλλογραφία μακρομορίων ένα μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας $R=0.2-0.3$ είναι αξιόπιστο. Επίσης, ένας άλλος δείκτης της ποιότητας του μοντέλου (πιο αξιόπιστος σε σύγκριση με τον πιο πάνω) αποτελεί ο R_{free} που αντιστοιχεί στον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας R για ένα 5% ανακλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση.

4.6.6. Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου [Dreath, 2002]

Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου είναι η διαδικασία προσαρμογής του μοντέλου (δηλ. των συντεταγμένων x, y, z για κάθε άτομο της ασύμμετρης μονάδας) έτσι ώστε οι πειραματικοί και οι υπολογιζόμενοι (χρησιμοποιώντας το μοντέλο) δομικοί παράγοντες να βρίσκονται σε όσο καλύτερη συμφωνία γίνεται. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας, R , και ο R_{free} αποτελούν κριτήρια της συμφωνίας αυτής. Η προσαρμογή του μοντέλου περιλαμβάνει την αλλαγή στις θέσεις των ατόμων και των παραγόντων θερμοκρασίας για όλα τα άτομα της δομής εκτός από τα υδρογόνα. Επειδή τα υδρογόνα έχουν μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η επίδρασή τους στην σκέδαση είναι πολύ μικρή γι' αυτό και συνήθως δεν λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό της δομής.

Εδώ να αναφερθεί ότι θερμικός παράγοντας (B , temperature factor ή παράγοντας Debye-Waller) αποτελεί μέτρο της δόνησης των ατόμων και επηρεάζει το μέγεθος του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από κάθε πυρήνα ατόμου λόγω της επίδρασής του στον ατομικό παράγοντα σκέδασης. Ορίζεται ως:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (1.11),$$

όπου $\langle u^2 \rangle$ αντιστοιχεί στο τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους δόνησης, όταν υποθέσουμε ότι έχουμε ισότροπη και αρμονική δόνηση ατόμων (π.χ. για $B=30\text{Å}^2$, $\langle u^2 \rangle = \sqrt{30/8\pi^2} = 0.62\text{Å}$, δίνει μια αίσθηση της δόνησης των ατόμων). Στην περίπτωση προσδιορισμού δομής πρωτεϊνών είναι σύνηθες να δουλεύουμε με ισότροπους θερμικούς παράγοντες για το κάθε άτομο λόγω της μικρής ευκρίνειας των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν τέσσερις παράμετροι που πρέπει να προσδιορισθούν για κάθε άτομο: x, y, z και B . Μια πρωτεΐνη με 2000 άτομα στην ασύμμετρη μονάδα έχει 8000 παραμέτρους άγνωστους που πρέπει να προσδιοριστούν. Σ' αυτή την περίπτωση για την απόδοση μιας αξιόπιστης δομής πρέπει τα δεδομένα (εντάσεις ανακλάσεων) να είναι περίπου ίσα με τον αριθμό των παραμέτρων. Επίσης μια μέση τιμή B για μια πρωτεΐνη που κυμαίνεται από μερικά Å^2 μέχρι 30Å^2 αποτελεί μια καλά οργανωμένη δομή.

Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων [Dreath, 2002]

Η μέθοδος βελτιστοποίησης του μοντέλου με ελάχιστα τετράγωνα αποτελεί μια βελτιστοποίηση στον ανάστροφο χώρο (reciprocal-space refinement), αφού οι υπολογισμοί γίνονται μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών πλατών δομικών παραγόντων (δηλ. στοιχεία του ανάστροφου χώρου) και όχι με την εξέταση του χάρτη πυκνότητας και του μοντέλου (πραγματικός χώρος).

Σε μια απλή μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων σε δυο διαστάσεις, στόχος είναι να βρεθεί μια συνάρτηση $\psi=f(x)$ που να διαγράφει μια σειρά πειραματικών δεδομένων $(x_1, \psi_1), (x_2, \psi_2), (x_3, \psi_3), \dots, (x_i, \psi_i)$. Η λύση στο πρόβλημα είναι μια συνάρτηση $\psi=f(x)$ για την οποία το άθροισμα των τετραγώνων των αποστάσεων των δεδομένων και της συνάρτησης της ίδιας να είναι η ελάχιστη δυνατή. Με άλλα λόγια η $\psi=f(x)$ είναι η συνάρτηση που ελαχιστοποιεί το D , που αποτελεί το άθροισμα των διαφορών των πειραματικών και θεωρητικών τιμών.

Στην περίπτωση της κρυσταλλογραφικής βελτιστοποίησης προσπαθούμε να ελαχιστοποιήσουμε την συνάρτηση Φ που ισούται με,

$$\Phi = \sum w_{hkl} (|F_o| - |F_c|)^2, \quad hkl$$

η οποία αποτελεί άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών των πειραματικών και θεωρητικών πλατών δομικών παραγόντων (όπου w ένας παράγοντας που εμπεριέχει την αξιοπιστία της κάθε μέτρησης έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη σε μεγαλύτερο βαθμό τα πιο αξιόπιστα δεδομένα).

4.6.7. Έλεγχος του δομικού μοντέλου

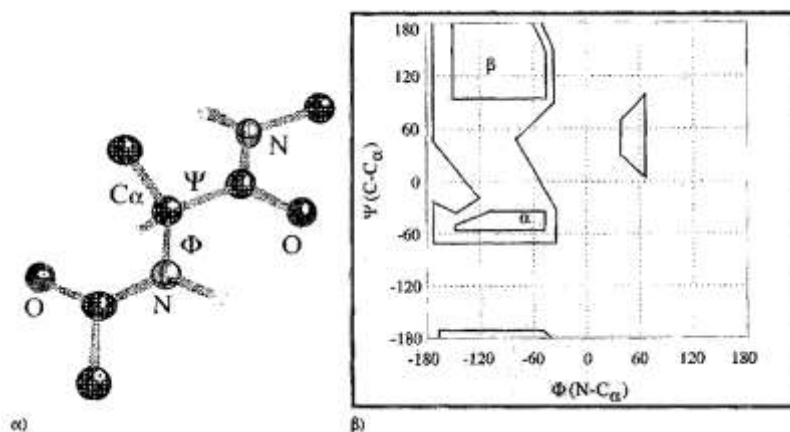
Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος αυτού έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφορών στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικό δεσμοί, δίεδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση) [Τσιτσάνου, 2001].

Δείκτες αξιοπιστίας R [Dreath, 2002]

Η ακρίβεια του μοντέλου μπορεί να ελεγχθεί με τον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας. Παρόλο που η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον στην εκτίμηση της ακρίβειας ενός μοντέλου, έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα που έχουν βελτιστοποιηθεί και έχουν χαμηλούς κρυσταλλογραφικούς δείκτες, να εμφανίζονται στην συνέχεια ανακριβή (π.χ. γιατί ο αριθμός των παραμέτρων που προσδιορίστηκαν ήταν πολύ μεγάλος).

Ο κρυσταλλογράφος Brünger (1992,1993) πρότεινε την εισαγωγή του δείκτη R_{free} (free R-factor), που δεν επηρεάζεται από την επεξεργασία βελτιστοποίησης. Στην μέθοδο αυτή οι ανακλάσεις χωρίζονται στο σύνολο δοκιμής (test set) και το σύνολο εργασίας (working set). Οι ανακλάσεις δοκιμής επιλέγονται τυχαία και αποτελούν το 5-10% των πειραματικών ανακλάσεων. Η βελτιστοποίηση γίνεται με το σύνολο εργασίας και τέλος υπολογίζεται ο δείκτης R_{free} για τις ανακλάσεις δοκιμής. Η μέθοδος αυτή εκτίμησης καλείται πιστοποίηση (cross-validation) και η αρχή της στηρίζεται στο γεγονός ότι όταν μια δομή έχει βελτιστοποιηθεί αρκετά, τότε και οι

δύο δείκτες R_{free} και $R_{\text{working set}}$ πρέπει να μην μειώνονται άλλο. Αν όμως, ο $R_{\text{working set}}$ μειώνεται λαμβάνοντας υπόψη θόρυβο, τότε ο R_{free} θα αυξηθεί.



Σχήμα 26: α) Ορισμός των ϕ ($C\alpha-N$) και ψ ($C\alpha-C$) δίδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμμα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α -έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια [Rhodes].

Διάγραμμα Ramachandran

Η στεreoχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι δίδρες γωνίες ϕ και ψ για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως αυτό που φαίνεται στο Σχήμα 26β.

Ο G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος ϕ και ψ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης.

Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στεreoχημεία.

Πειραματικό μέρος

5. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης γλυκογόνου από κουνέλι γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962) με μικρές μόνο τροποποιήσεις (π.χ. χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) (Melpidou & Oikonomakos, 1983).

ΥΛΙΚΑ

- Κουνέλια (4 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, (10mM β-GP/HCL, 10mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT), pH 6.8
β-φωσφογλυκερόλη, C₃H₇Na₂O₆P.5 H₂O, MB 306.12 g/mol (MERCK)
β-μερκαπτοαιθανόλη, C₂H₆OS, MB 78.3 g/mol 14.7M (SERVA)
EDTA, C₁₀H₁₄N₂O₈NA₂.2H₂O, MB 372.5 g/mol (SERVA)
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃
Όξινο ανθρακικό κάλιο, KHCO₃, MB 100.12 g/mol (MERCK)
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
Οξικό οξύ, CH₃COOH 1L=1.05 Kg, MB 80,05 g/mol 14.7M (SERVA)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
Θειϊκό αμμώνιο, (NH₄)₂SO₄, MB 131.1 g/mol 14.7M, (SIGMA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.001M (pH 7.5)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 2.0M
Τρις-(υδροξυμεθύλο)-αμινομεθάνιο, C₄H₁₁NO₃ MB 121.1 g/mol (SERVA)
- Διάλυμα EDTA 0.1M (pH 7.0)
EDTA, C₁₀H₁₄N₂O₈NA₂.2H₂O, MB 372.5 g/mol (SERVA)
- Διάλυμα AMP 0.1M (pH 7.0)
5'-φωσφορική αδενοσίνη, AMP, MB 347.2 g/mol (SIGMA)
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
Οξικό μαγνήσιο, (CH₃COO)₂ Mg
- Γλυκερόλη (φυτική), C₃H₈O₃, MB 92.1 g/mol (SERVA)
- Απιονισμένο νερό
- Μεμβράνες διαπίδυσης
Κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10 mM στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό πραγματοποιήθηκαν πριν από τη χρήση τους

ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος Sorvall RC5-C (Sorval, USA) με κεφαλή SS-34
- Πεχάμετρο: Metrohm 744
- Φασματοφωτόμετρο: UV-Visible spectrophotometer (CARY)

ΠΟΡΕΙΑ

Βήμα 1: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από ~4 κουνέλια. Οι μύες αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2: Ώξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων.

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με την προσθήκη CH_3COOH 1N. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min, όπου και παρατηρείται η σταδιακή αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος (κατακρήμνιση πρωτεϊνών). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4200 x g για 30 min σε θερμοκρασία 3°C, το υπερκείμενο υγρό διηθείται για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και γίνεται ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO_3 .

Βήμα 3: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο.

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου καταβυθίζεται σε 41% κορεσμό θειϊκού αμμωνίου με την προσθήκη διαλύματος θειϊκού αμμωνίου σε 90% κορεσμό όγκου ίσου με 0.837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος. Το μίγμα αφήνεται στους 3°C για 24 ώρες. Μετά από την προσεχτική απόχυση του υπερκείμενου, το ίζημα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση στα 5000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH.

Μετά την διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται τα ακόλουθα:
α) κατάλληλος όγκος ουδέτερου διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 3×10^{-2} M β) ουδέτερο διάλυμα EDTA 0.1M γ) κατάλληλη ποσότητα αλκαλικού διαλύματος Tris 2.0M για τη ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη

ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 5: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση προάγοντας τον τετραμερισμό της GP. Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης ($\beta\text{-GP/Merc/EDTA}$, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου.

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση στα 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C. Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 280 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $E^{1\%}_{280\text{ nm}} = 13.2$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm (Kastenschmidt, et al., 1968).

5.1. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, sa, $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας (mg ενζύμου), αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου που

προκαλεί μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

- Ρυθμιστικά διαλύματα.

❖ β -GP (50 mM), β -μερκαπτοαιθανόλη πυκνή (50 mM), EDTA (1mM) pH 6.8.

Χρησιμοποιήθηκε για αραιώσεις του ενζύμου

β -φωσφογλυκερόλη, $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$, MB 306,12 g/mol (MERCK)

β -μερκαπτοαιθανόλη, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, MB 78,3 g/mol (SERVA)

EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MB 372,5 g/mol (SERVA)

❖ imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) pH 6.8

ιμιδαζόλιο

γλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA) η μεγάλη συγκέντρωση του

KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα

EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MB 372,5 g/mol (SERVA)

Διθειοθρεϊτόλη, DTT, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξειδωση του ενζύμου ή μικροετερογένεια κατά την κρυστάλλωση.

- διάλυμα α -D-G-1-P 400mM

α -D-1-φωσφορική γλυκόζη, α -D-G-1-P, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_9\text{PNa}_2$, MB 376.06 g/mol (SIGMA)

- διάλυμα γλυκογόνου 10% w/v

γλυκογόνο (oyster glycogen) (SIGMA).

Πιθανές προσμίξεις νουκλεοτιδίων απομακρύνθηκαν σύμφωνα τη μέθοδο των Helmreich & Cori (1964), η οποία περιελάμβανε:

α) Κατεργασία με ενεργό άνθρακα.

β) Φυγοκέντρωση στους 0- 4 °C.

γ) Διήθηση με φίλτρα Whatman N°1.

δ) Καταβύθιση με 1.5 όγκο απόλυτης αλκοόλης.

ε) Διήθηση υπό κενό και λυοφίληση στους -20 °C για 12 – 15 ώρες.

Το στερεό διαλυτοποιήθηκε στον κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος, ώστε η τελική συγκέντρωση του γλυκογόνου να είναι 10% w/v.

Φυλάσσεται στους -20 °C.

- Διάλυμα AMP 50mM pH 6.8

5'-φωσφορική αδενοσίνη, AMP MB 347.2 g/mol (SIGMA)

- Διάλυμα SDS 1% w/v
Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο, SDS, C₁₂H₂₅NaO₄S, MB 288,38 g/mol, (SIGMA)
- Διάλυμα ενζύμου GPb
- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου pH 5.0
Μολυβδαινικό αμμώνιο, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, MB 1236,86 g/mol (MERCK)
Οξικός ψευδάργυρος, Zn(CH₃COO)₂, MB 219,49 g/mol (SIGMA)
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH 5.0
L(+)ασκορβικό οξύ, C₆H₈O₆, MB 176,13 g/mol (MERCK)
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Φωτόμετρο, Ορατού-υπεριώδους
- Φασματοφωτόμετρο, **Novaspec II spectrofotometer**, (Pharmacia Biotech)
- Υδρόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30°C)
- Χρονόμετρο
- Πιπέτες, **Gilson P1000-P10** (Gilson, France)
- Αναδευτήρας

Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και με pH6.8.

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και pH6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος GLC-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

- Glc-1-P 45mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 40.5mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί η φυσική υδρόλυση της Glc-1-P.

Πορεία:

Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε 50% γλυκερόλη παίρνουμε μικρή ποσότητα και το αραιώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα β-GP (50 mM), β-Merc (50 mM), EDTA (1mM) pH 6.8 προς όγκο 1ml. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm, αφού προηγουμένως έχει γίνει ρύθμιση μηδενικής απορρόφησης με το ρυθμιστικό διάλυμα ($\Pi = A \times L / \epsilon$, Π σε mg/ml, $L = 1$ cm, $\epsilon = 1,32$ ml \times cm/mg και A η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280nm, η οποία οφείλεται στους αρωματικούς δακτυλίους των αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης του ενζύμου).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται διάλυμα το οποίο περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια σε τελικές αναλογίες:

- GPb 25μg/ml
- Γλυκογόνο 1% w/v
- Ρυθμιστικό διάλυμα β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM

Παρασκευή διαλυμάτων με διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα τελικού όγκου 720μl και pH6.8 με ανάμιξη των προαναφερθέντων διαλυμάτων Glc-1-P και διαλύματος AMP 50mM

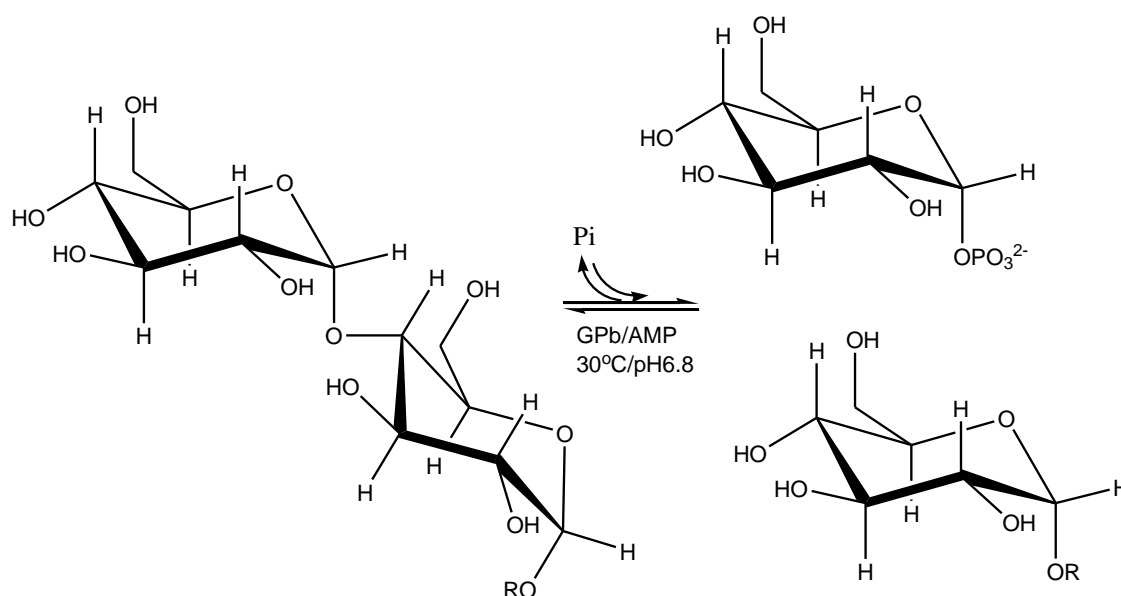
1. Glc-1-P 25.00mM, AMP 1.25mM

2. Glc-1-P 12.50mM, AMP 1.25mM
3. Glc-1-P 7.50mM, AMP 1.25mM
4. Glc-1-P 5.00mM, AMP 1.25mM
5. Glc-1-P 2.50mM, AMP 1.25mM

5.1.1. Προσδιορισμός K_m της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , M) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (G-1-P).

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Στην αντίδραση ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία και μετρώνται. Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP και γλυκογόνο (1.0 mM και 1.0% αντίστοιχα) ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις,

όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης (Segel, 1975).

Η V_{max} δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια και κατά συνέπεια ούτε η K_m . Έτσι, οι τιμές V_{max} και K_m προσδιορίζονται γραφικά με χρήση του προγράμματος Graffit (Letherbarrow, 1990). Για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m της GPb πραγματοποιείται κινητική μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος 1-φωσφορική α -D-γλυκόζης.

ΠΟΡΕΙΑ

Παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης GPb 5 μ g/ml, γλυκογόνου 0.2%), ρυθμιστικού διαλύματος β GP-Merc-EDTA 2.5:2.5:0.05 mM. Οι τελικές συγκεντρώσεις έχουν υπολογιστεί στον όγκο της αντίδρασης, δηλ. 900 μ l. Το μίγμα επωάζεται για 15min στους 30°C. Τα υποστρώματα παρασκευάζονται με προσθήκη 200 μ l υποστρώματος (τελικών συγκεντρώσεων 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 mM), AMP 0.1M.

Στη συνέχεια, τα υποστρώματα τοποθετούνται στο υδρόλουτρο για 5 min ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα. Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μ l από το ενζυμικό μίγμα ανά 20 sec σε κάθε υπόστρωμα με όγκο 720 μ l, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, ανά 20 sec, από τους δοκιμαστικούς σωλήνες λαμβάνονται 200 μ l και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ l SDS 1%.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρησή τους στα 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζονται τα P_i που έχουν απελευθερωθεί στην αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit προκειμένου να προσδιοριστεί η K_m .

5.2. Προσδιορισμός της IC_{50} αναστολέα

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία προκαλείται 50% μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Ο προσδιορισμός προϋποθέτει την κινητική μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση α -D-G-1-P.

ΠΟΡΕΙΑ

Κατάλληλη ποσότητα μείγματος ενζύμου το οποίο έχει μελετηθεί κινητικά (προσδιορισμός K_m) παρασκευάζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα (25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 5% (w/v)). Σε συγκεντρώσεις αναστολέα και ίδια συγκέντρωση υποστρώματος (α-D-G-1-P) έτσι ώστε με την προσθήκη του ενζυμικού μείγματος η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: 5.0 μg ένζυμο/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2% w/v και υπόστρωμα α-D-G-1-P σταθερή συγκέντρωση και αναστολέα μεταβαλλόμενη. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8.

Το κινητικό πείραμα που ακολουθεί είναι παρόμοιο με τον προσδιορισμό δραστηριότητας της φωσφορυλάσης b. Το κινητικό πείραμα παρουσία αναστολέα πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που γίνεται ο προσδιορισμός δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.

5.3. Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε τους βιοχημικούς σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

5.3.1. Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ (Saheki et al, 1985). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ιόντα φωσφόρου πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4μmol προκειμένου να είναι ανιχνεύσιμα από το φασματοφωτόμετρο.

ΥΛΙΚΑ

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε δοχείο πολυαιθυλενίου και μακριά από το φως).

Μολυβδαινικό αμμώνιο, 15mM (MERCK)

Οξικός ψευδάργυρος, 100mM (SIGMA)

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα) -ασκορβικό οξύ (MERCK)

- Αντιδραστήριο χρώσης
 - Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου και ασκορβικού οξέος

ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο Novaspec II spectrophotometer (Pharmacia Biotech)
- Υδρόλουτρο
- Χρονόμετρο

ΠΟΡΕΙΑ

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5ml από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο 30°C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 850 nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

5.3.2. Επεξεργασία κινητικών αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά τον προσδιορισμό του φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Graffit (Leatherbarrow, 1990). Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D-G-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών ιόντων σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,

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

όπου: v: ταχύτητα

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα [S]: συγκέντρωση υποστρώματος

K_m σταθερά Michaelis-Menten

Σχεδιάζεται η καμπύλη $V=f([S])$, με χρήση της παραπάνω εξίσωσης η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{max} με το πρόγραμμα Graffit.

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

5.4. Κρυστάλλωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου

ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου (10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN_3 , 2 mM DTT pH 6.7)
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Ελαιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 nm και μήκους 3 cm

ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο UV-Visible spectrophotometer (CARY)
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 nm και μήκους 3cm

ΠΟΡΕΙΑ

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι το ένζυμο θα πρέπει να είναι σε καθαρή μορφή. Για αυτό το λόγο ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση της γλυκερόλης και των νουκλεοτιδίων που μπορεί να περιέχει το ενζυμικό διάλυμα. Το ένζυμο τοποθετείται σε σάκο διαπίδυσης και ακολουθεί διαπίδυση με BES για 16hrs. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Το ενζυμικό διάλυμα στη συνέχεια φωτομετρείται στα 280nm για να προσδιοριστεί η ενζυμική του συγκέντρωση η οποία δεν πρέπει να είναι κάτω από τα 18 mg/ml (ιδανικότερα να κυμαίνεται στα 20-25 mg/ml) και στα 260nm για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων. Ο λόγος A_{260}/A_{280} πρέπει να είναι ~ 0.53.

5.4.1. Σχηματισμός κρυστάλλων

Για το σχηματισμό των κρυστάλλων μπορεί να εφαρμοστεί πληθώρα μεθόδων όπως αυτή της κρεμάμενης ή καθήμενης σταγόνας (hanging drop, sitting drop), batch κ.ά. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (στην T διαμόρφωση) γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο batch (Oikonomakos et al, 1985). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Το προς κρυστάλλωση ενζυμικό μίγμα περιέχει 25.0mg/ml ένζυμο, 1.0mM σπερμίνη, 3.0mM DTT, 0.1mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN_3 (pH 6.7). Το μίγμα χωρίζεται σε σωλήνες, σφραγίζεται και αφήνεται στους 16°C. Οι κρύσταλλοι της GPb (στην T διαμόρφωση), αναπτύσσονται στο τετραγωνικό πλέγμα (ομάδας χώρου συμμετρίας $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων. Το μίγμα χωρίζεται σε διαλύματα ίσου όγκου τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνες, σφραγίζονται και παραμένουν στους 16°C για να σχηματισθούν οι κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται στο τετραγωνικό πλέγμα συμμετρίας και ειδικότερα στην ομάδα χώρου $P4_32_12$. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για πειράματα περίθλασης ακτίνων X.

5.4.2. Κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb- 11MS023

Για να εντοπίσουμε το κέντρο σύνδεσης και να μελετήσουμε το μηχανισμό αναστολής της 11MS023 προσδιορίσαμε την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου φωσφορυλάσης γλυκογόνου 11MS023.

5.4.3. Συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των δεδομένων διεξήχθη σε κρυογονικές συνθήκες (30% DMSO)-θερμοκρασία 100 K (-173°C), σε ρεύμα υγρού αζώτου.

ΥΛΙΚΑ:

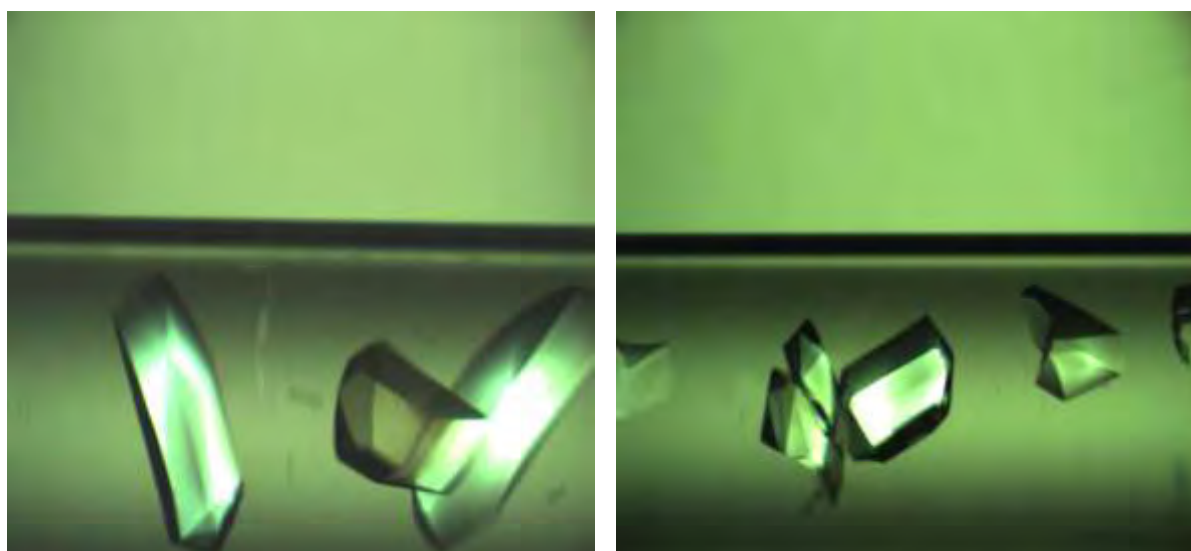
- Κρύσταλλοι συμπλόκου GPb-ένωσης #21
- Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA, 2% NaN_3 , 3 mM DTT, pH 6.7)
- Τριχοειδείς σωλήνες διαμέτρου (1.0-1.5 mm) (GLAS)
- Κερί
- Σύριγγες
- Ανατομικά εργαλεία καθαρισμού και μετακίνησης κρυστάλλων

ΟΡΓΑΝΑ:

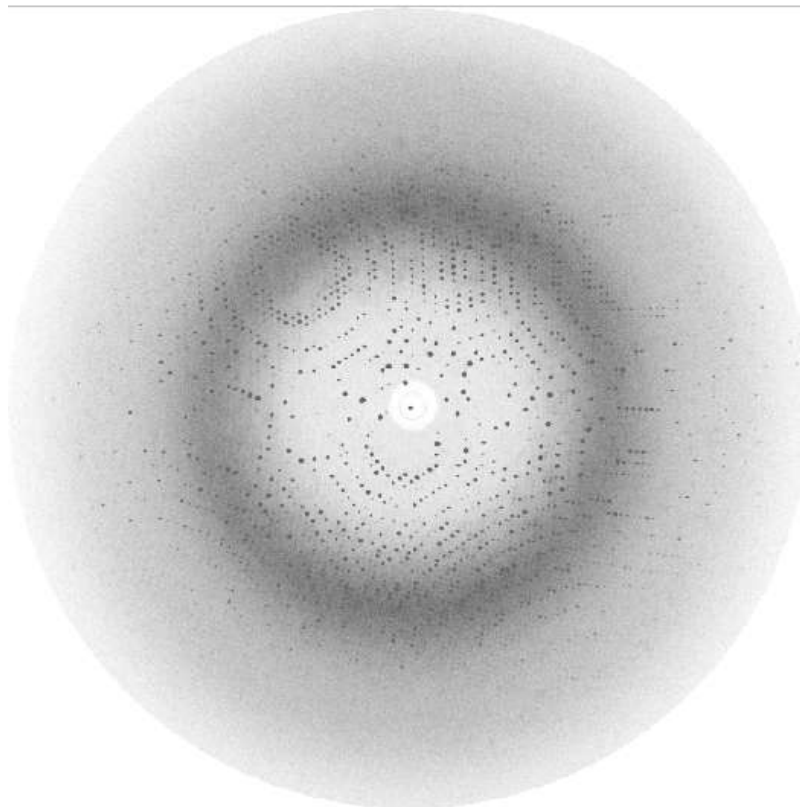
- Μικροσκόπιο
- Soldering iron
- Πηγή ακτίνων X ($\lambda=0.97976 \text{ \AA}$, συγχροτρονική ακτινοβολία, Σταθμός PX10.1, CCLRC Daresbury Laboratory, Daresbury, UK)
- Ανιχνευτής (image plate, πεδιάς)
- Γωνιομετρική κεφαλή

ΠΟΡΕΙΑ

Ο κρύσταλλος συμπλόκου GPb-aventis#21, που αναπτύχθηκε με τη μέθοδο batch (Oikonomakos et al., 2000) τοποθετήθηκε στη διάταξη του σχήματος με τέτοιο τρόπο ώστε κατά την περιστροφή του να παραμένει στη δέσμη της ακτινοβολίας ακτίνων X. Η έκθεση μονοκρυστάλλου πρωτεΐνης σε ακτίνες X έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία και την ελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης αυτής ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλους ανιχνευτές και να γίνει συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα περιθλασιγράμματα αυτά αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία και μετά από κατάλληλη επεξεργασία με κρυσταλλογραφικά προγράμματα υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της πρωτεΐνης ή συμπλόκου πρωτεΐνης – αναστολέα.

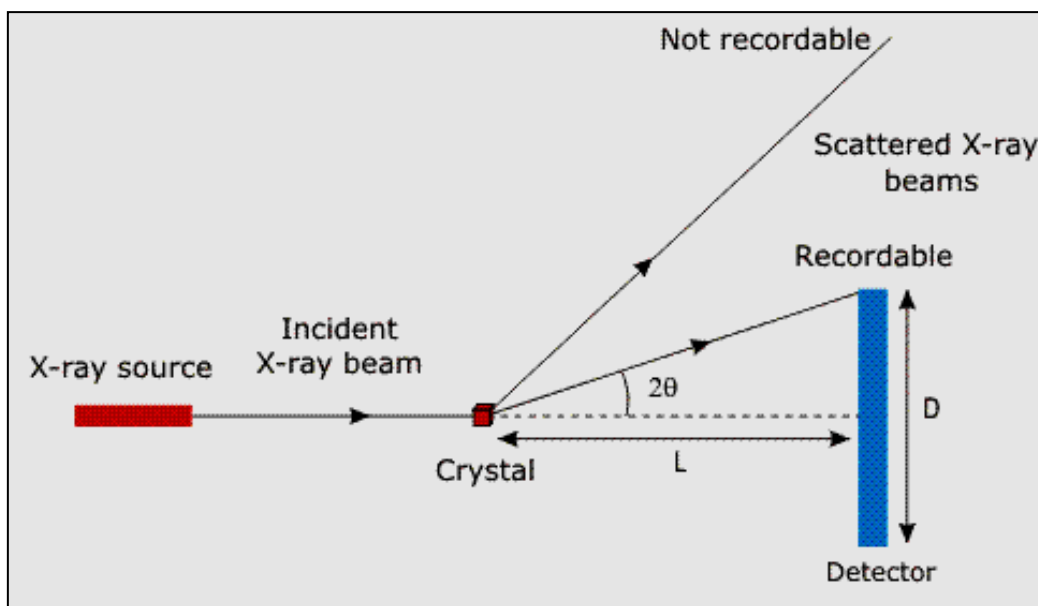


Εικόνα 5: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι φωσφορυλάσης γλυκογόνου b (διαμόρφωσης T) (ομάδας χώρου $P4_32_12$, μοναδιαίας κυψελίδας $a=b=128.5 \text{ \AA}$ $c=116.3 \text{ \AA}$ και με μια υπομονάδα στην ασύμμετρη μονάδα) που έχουν αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch σύμφωνα με τους Oikonomakos et al. (1985). Η φωτογραφία ελήφθη με στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 6: Περιθλασίγραμμα κρυστάλλου φωσφορυλάσης γλυκογόνου b.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας (λ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου (d), χρόνος έκθεσης (t), γωνία περιστροφής και αριθμός περιθλασιγραμμάτων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου- ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στο Σχήμα 27 παρουσιάζονται επίσης, τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων X.



Σχήμα 27. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πειραματικής διάταξης περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία 2θ και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση L από τον κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από τον νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία θ (2θ αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση L , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια (Rhodes, 2000).

5.5. Βελτιστοποίηση και ανοικοδόμηση πρωτεϊνικού μοντέλου

Μετά την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακολουθεί ο υπολογισμός των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o - F_c$, $F_o - F_c$ (F_o : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από πειραματικούς δομικούς παράγοντες, F_c : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από θεωρητικούς δομικούς παράγοντες του μοντέλου).

Η δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο για τον υπολογισμό των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC (CCP4, 1994). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το πηλίκο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των

πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων.

Υπολογισμός των παραπάνω χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας (F_o-F_c και $2F_o-F_c$), στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου που υποδήλωνε χωρίς αμφιβολία τη σύνδεση της ένωσης. Η ένωση σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα SYBYL (Tripos Associates, 1992) και προσαρμόστηκε στην πυκνότητα με μικρή μεταβολή των διεδρων γωνιών με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών «O» (Jones et al., 1991).

Ένα μέρος των δεδομένων περίθλασης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R, ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης (R_{free}) (Brunger, 1992). Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα #21) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διεδρες γωνίες, κ.ά.).

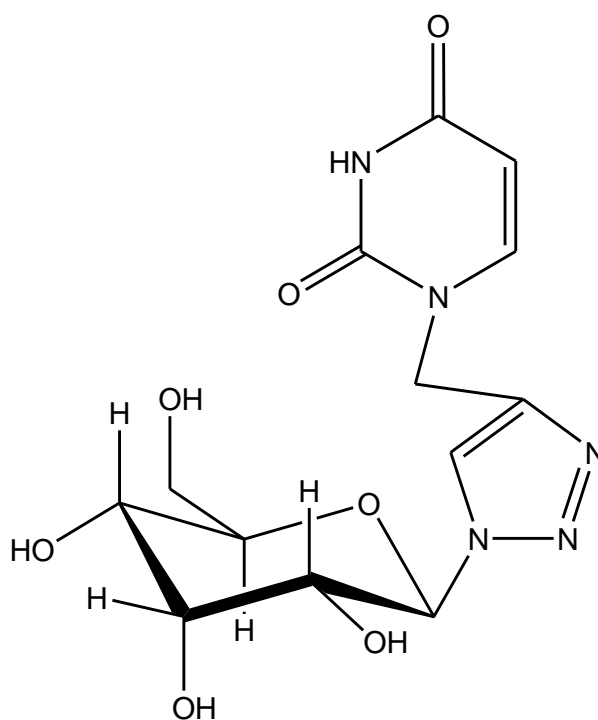
Για τα στάδια βελτιστοποίησης που ακολουθήθηκαν εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που υπαγορεύεται από το πρόγραμμα REFMAC (Murshudov et al., 1997). Κάθε κύκλος βελτιστοποίησης συνοδεύεται από τη δια χειρός ανοικοδόμηση του πρωτεϊνικού μορίου με το πρόγραμμα "O" (Jones et al., 1991). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας F_o-F_c και $2F_o-F_c$. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα (7-251), (261-314), (324-836), 705 μόρια ύδατος, 6 μόρια DMSO, και τη φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από το τελευταίο στάδιο βελτιστοποίησης καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Ο έλεγχος της στερεοχημείας του πρωτεϊνικού μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα PROCHECK (CCP4, 1994) ενώ ο προσδιορισμός των δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων van der Waals της δομής του συμπλόκου, έγινε με το πρόγραμμα CONTACT (CCP4, 1994).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα ένα σύνολο εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: την υψηλή εκλεκτικότητα και την μεγάλη συγγένεια αυτών για την πρωτεΐνη-στόχο.

Η παρούσα εργασία αφορά στη βιοχημική και κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης 11MS023, ένα ανάλογο γλυκόζης, ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου GPb. Η ένωση 11MS023 έχει σχεδιασθεί με τη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού και έχει ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η σύνθεση της ένωσης 11MS023 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Αν. καθ. Δημήτριου Κομιώτη (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχήμα 28)



Σχήμα 28: Ο συντακτικός τύπος της ένωσης 11MS023.

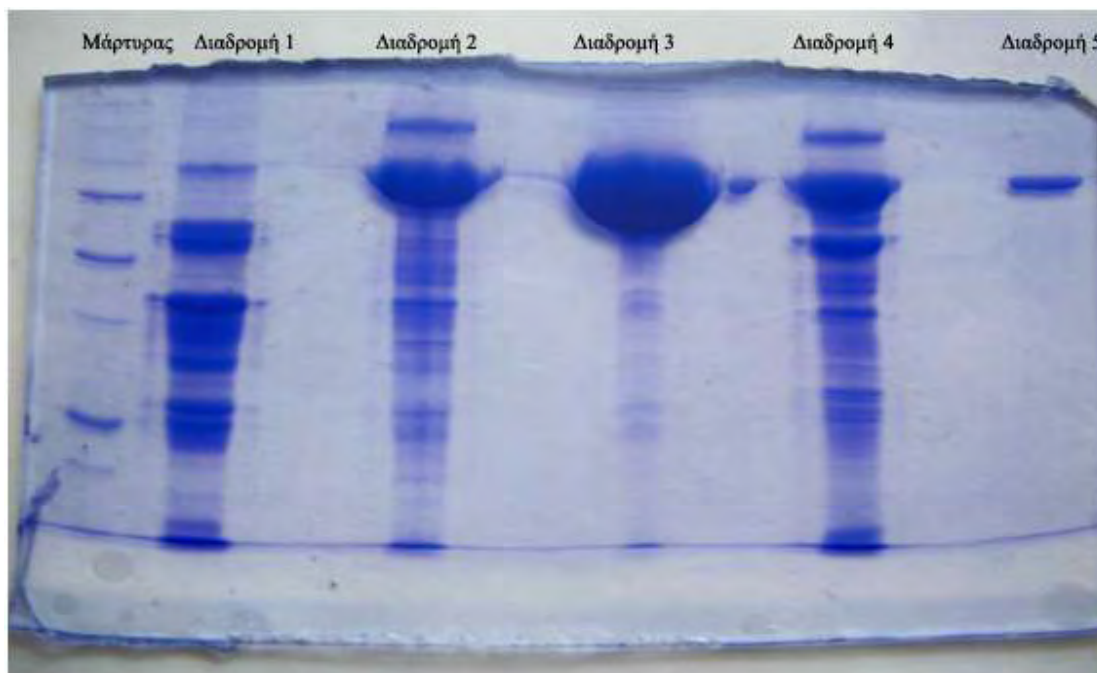
Οι τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο batch οι οποίοι εμποτίστηκαν με διάλυμα του αναστολέα για το σχηματισμό του συμπλόκου

GPb:11MS023. Ακολούθησε προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου υποδεικνύει το κέντρο σύνδεσης του αναστολέα. Ο τρόπος σύνδεσης αυτού στο αντίστοιχο κέντρο ερμηνεύεται με τη βοήθεια των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με τα γύρω αμινοξέα κατά τη σύνδεσή του σε αυτό. Επίσης, γίνεται συσχετισμός της ανασταλτικής δράσης του ενζύμου όπως αυτή προσδιορίστηκε με κινητικά πειράματα με την πληροφορία από τη δομική μελέτη και ακολουθεί σύγκριση της δράσης της ένωσης που μελετάται με ανάλογες ενώσεις της ίδιας κατηγορίας.

6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ β ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η φωσφορυλάση β του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).



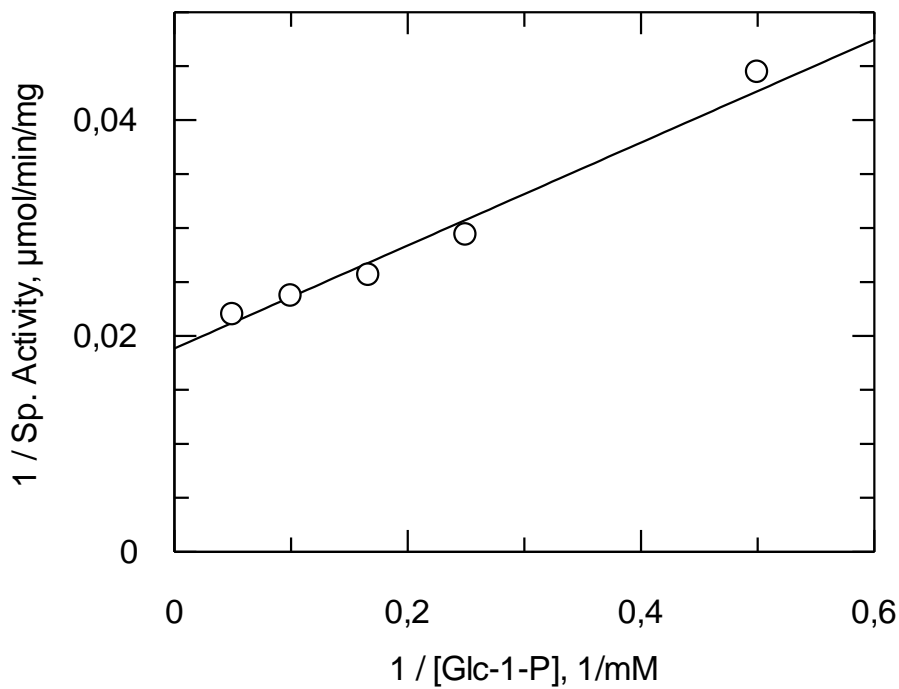
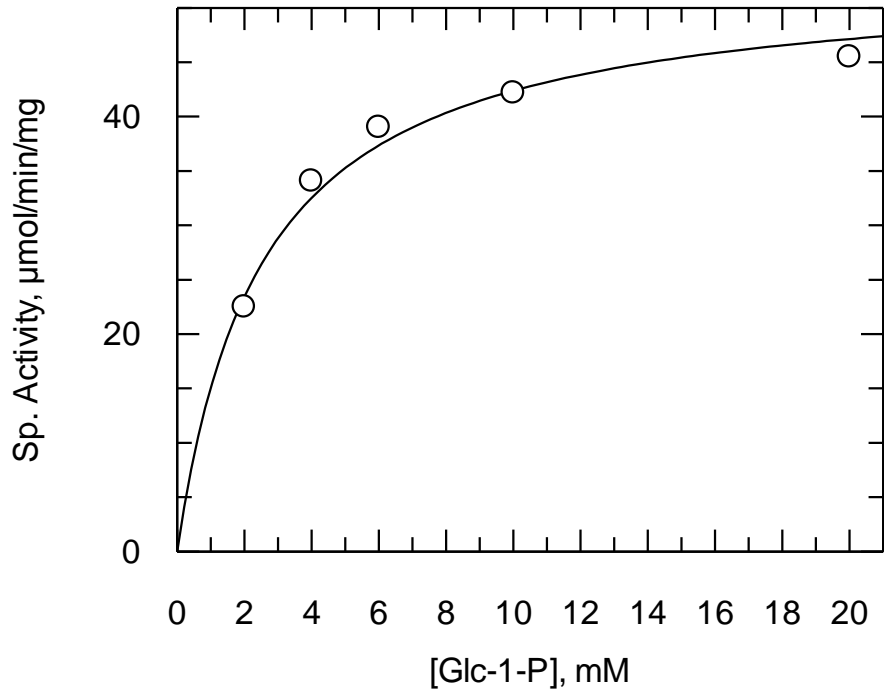
Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική καταρραγή σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

6.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

6.3.1. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . (βλ. Πειραματικό μέρος)

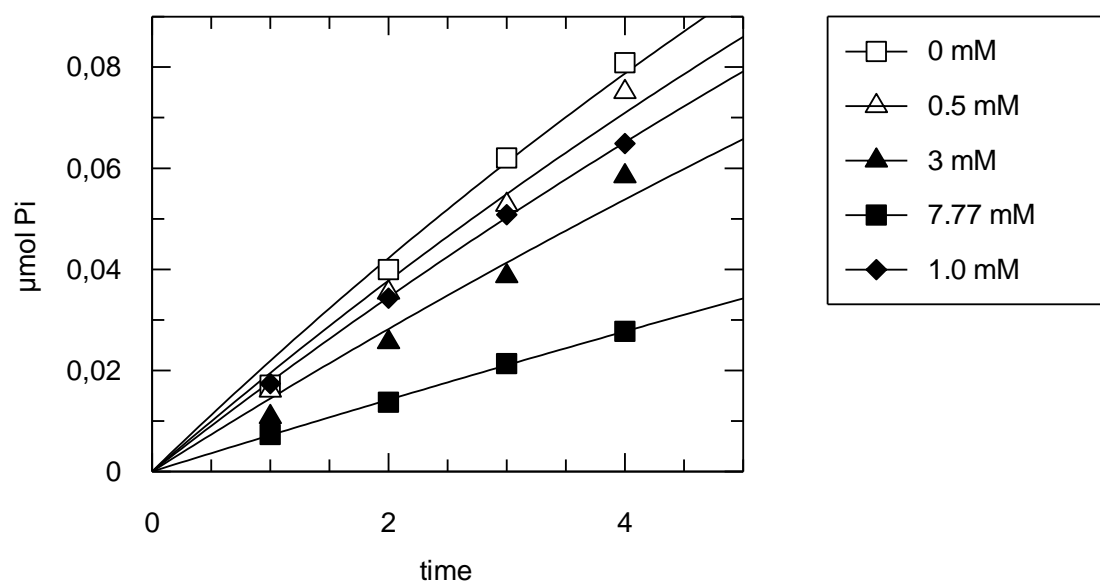
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 2.53 \pm 0.34$ mM και $V_{max} = 53.09 \pm 2.51$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο σχήμα 29 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P). Επειδή, δεν είναι πάντοτε δυνατό να καθοριστεί, τότε επιτυγχάνεται η V_{max} , γιατί η καμπύλη σχήματος υπερβολής, έχει βαθμιαία ανοδική κλίση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, αν παρασταθεί γραφικά η $1/v_0$ ως προς την $1/[S]$, τότε λαμβάνεται ευθεία γραμμή (Lineweaver-Burk). Το διάγραμμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της K_m και της V_{max} .



Σχήμα 29: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο δεύτερο σχήμα παρουσιάζεται το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk) από όπου υπολογίζονται οι τιμές V_{max} και K_m .

6.3.2. Κινητική μελέτη αναστολέα

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκε η ένωση 11MS023 ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται τα διαγράμματα της παραγωγής προϊόντος της αντίδρασης ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ ενζύμου) σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας (sp. act.) του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Graffit (Leatherberrow, 1997).

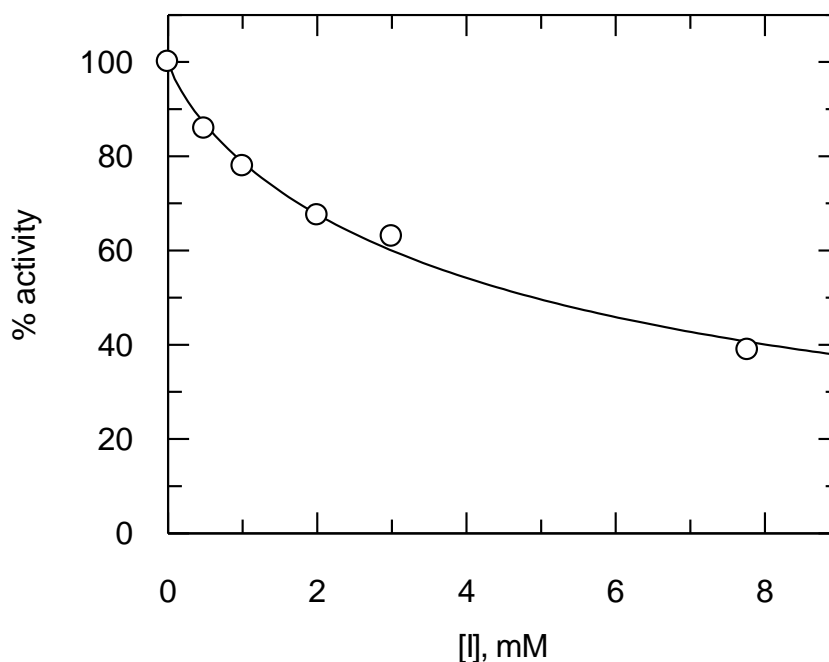


Η σταθερά IC_{50} , όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 5.2 υπολογίζει την % αναστολή του ενζύμου. Η σχέση που συνδέει την σταθερά IC_{50} με την K_i είναι:

$$IC_{50} = (1 + [S]/KM) * K_i$$

Μέσω της χρήσης του προγράμματος Graffit γίνεται επεξεργασία των αποτελεσμάτων των κινητικών πειραμάτων για τον αναστολέα 11MS023 προκύπτει το παραπάνω διάγραμμα, μέσω του οποίου η σταθερά IC_{50} υπολογίζεται σε 4.91 ± 0.35

mM. Η τελική συγκέντρωση των επί μέρους συστατικών της αντίδρασης ήταν G1P 2 mM, AMP 1 mM και γλυκογόνο 0.2% w/v. Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε σε απιονισμένο ύδωρ. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 488 μ M, 1 mM 2 mM, 3.0 mM και 7.7 mM.



Εικόνα 8: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 11MS023 και υπολογισμός της IC_{50} .

6.3.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης 11MS023

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης 11MS023. Τα επί μέρους στάδια της μελέτης είναι τα εξής:

Εμποτισμός μονοκρυστάλλου GPb (διαμόρφωση T) και συλλογή δεδομένων

Κρύσταλλος φωσφορυλάσης γλυκογόνου b, που είχε αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch (εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που περιείχε 15mM 11MS023 για 5 ώρες).

Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο EMBL στο Αμβούργο, στο σταθμό εργασίας X13 ($\lambda=0.8123 \text{ \AA}$). Τα δεδομένα συνελέγησαν σε ευκρίνεια 2.1 \AA , από 60 περιθλασιγράμματα με εύρος ταλάντωσης 0.8° ανά

πλαίσιο. Η ολοκλήρωση των περιθλαστικών δεδομένων και η συγχώνευση μεταξύ των πλαισίων των δεδομένων έγινε με τα προγράμματα DENZO και SCALEPACK. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυστάλλου ήταν $a=b=128.9 \text{ \AA}$, $c=116.8 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν τη συλλογή των δεδομένων περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b όπως παρουσιάζεται στο σύμπλοκο του ενζύμου με την α -D-γλυκόζη με τη βοήθεια του προγράμματος PHENIX (Adams, et. al., 2010). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το λόγο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων.

Ένα μέρος των δεδομένων περίθλασης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R, ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης (Brunger, 1992).

Πίνακας 3: Στατιστικά στοιχεία κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb-11MS023	
Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα 15mM 11MS023 για 5h
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Αμβούργο	X13
Μήκος κύματος, λ (Å)	0.8123 Å
Εύρος τάλαντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	60
Ομάδα χώρου συμμετρίας	$P4_32_12$
Διαστάσεις κυψελίδας	$a=b=128.9$, $c=116.8$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	30-2.1

Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	417937
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	57919 (2791)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)	0.061 (0.475)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.0 (99.0)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.14-2.10
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	14.4 (3.1)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	3.2 (3.2)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	26.3

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |(I_h) - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου (I_h) και I_{ih} είναι η μέση και η i -οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h , αντίστοιχα R_{iso} είναι η μέση κλασματική ισόμορφος διαφορά των ευρών των δομικών παραγόντων από τη φυσική GPb, T διαμόρφωσης.

** $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση του I .

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς Fo-Fc και 2Fo-Fc, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου που υποδήλωνε χωρίς αμφιβολία τη σύνδεση της ένωσης 11MS023 σε αυτό. Η ένωση σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα PHENIX (Adams, et. al., 2010) και προσαρμόστηκε στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα με μικρή μεταβολή των δίδρων γωνιών με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών COOT.

Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίδρες γωνίες, κ.ά.). Ο αρχικός κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας R_{free} ήταν 0.210 και ο R ήταν 0.160. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ιστροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας Fo-Fc και 2Fo-Fc. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα (10-251) (258-315) (325-835), 875 μόρια ύδατος, τον αναστολέα, ένα μόριο IMP, και την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-11MS023

Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου.

Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	34.18-2.1
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	57498 (2916)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	(10-251) (258-315) (325-835)
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6603
Αριθμός μορίων ύδατος	301
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R (R_{free})^*$	0.1587 (0.1960)
$R (R_{free})$ (Εξωτερική στοιβάδα)	0.2116 (0.2492)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.009
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.104
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	33.06
Ca, C, N, O	29.9
Πλευρική αλυσίδα	36.1
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (ετεροάτομα)	
IMP	84.2
11MS023	51.8
Μόρια ύδατος	36.5

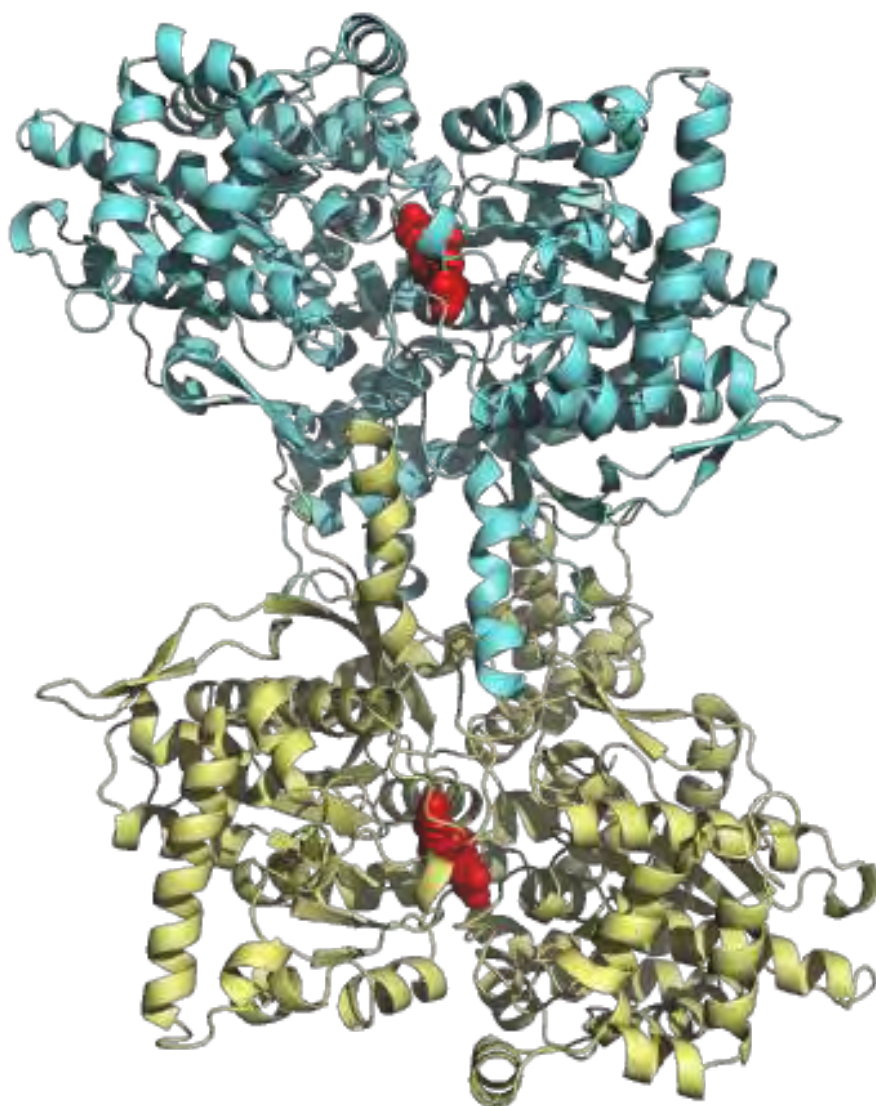
* Ο δείκτης αξιοπιστίας R ορίζεται ως $R = \frac{\sum (|F_o| - |F_c|)}{\sum F_o}$, όπου F_o και F_c είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων, αντίστοιχα.

[#] Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμεύει για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Η δομή του συμπλόκου GPb – 11MS023 χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

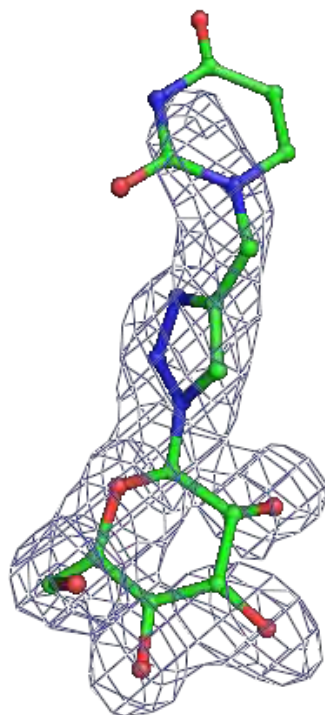
Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT (CCP4, 1994) με όριο απόστασης 3.35 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals.

Ο χάρτης διαφοράς $2F_o - F_c$ ηλεκτρονιακής πυκνότητας, οι μοριακές απεικονίσεις των αλληλεπιδράσεων της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και η υπέρθεση των συμπλόκων δομών GPb – 11MS023 και GPb-glc σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PyMol [DeLano, 2002].



Σχήμα 30: Διάγραμμα του διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου παρουσιάζεται η σύνδεση της ένωσης 11MS023 στο καταλυτικό κέντρο.

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου GPb:11MS023 προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή φωσφορυλάσης γλυκογόνου στην T διαμόρφωση απουσία αναστολέα. με τη βοήθεια του προγράμματος Refmac (CCP4, 1994). Σύμφωνα με το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας (σχήμα 31) ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Συνολικά, η ένωση 11MS023 μπορεί να σχηματίσει 18 δεσμούς υδρογόνου και 91 van der Waals αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου κατά τη σύνδεσή της σε αυτό.

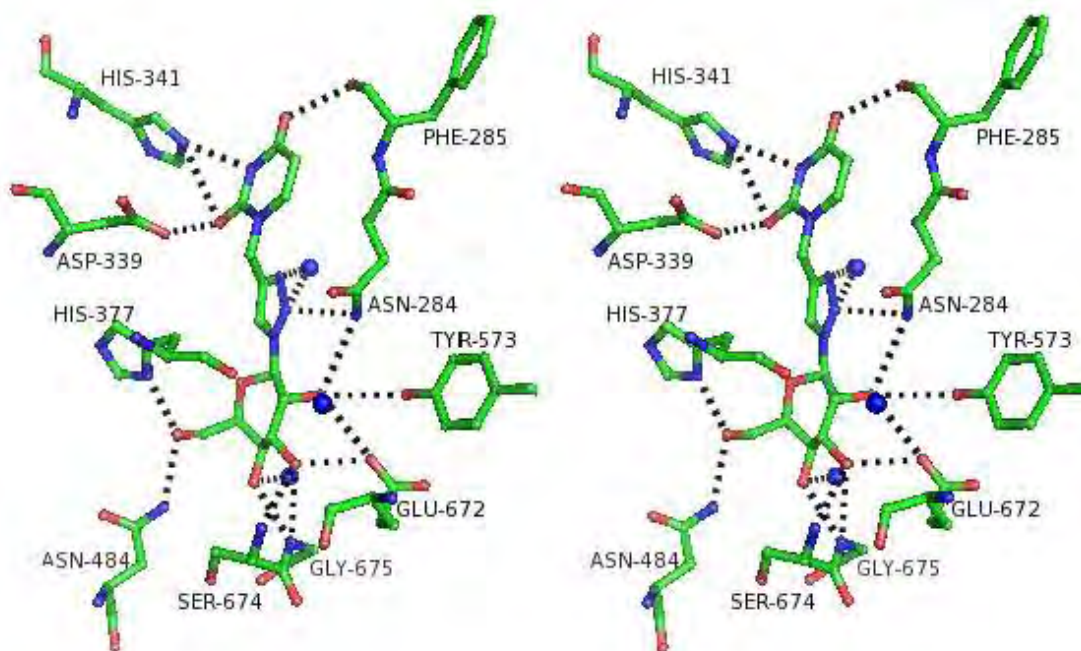


Σχήμα 31: Διάγραμμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fo-Fc στην οποία απεικονίζεται ο αναστολέας 11MS023 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο της GPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)
N08	Asn284 ND2	3.3
N08	W241	2.9
N09	W241	3.1
N16	His341 NE2	2.8
O18	Asp339 OD1 His341 NE2	3.1 3.3
O19	Phe285 O	3.0
O22	Asn284 ND2 Glu672 OE1 Tyr573 OH W243	3.3 3.0 3.2 2.8

O23	Gly675 N W117	2.8 2.8
O25	Gly675 N Glu672 OE1 Ser674 N	3.1 2.8 3.0
O04	His377 ND1 Asn484 ND2	2.6 3.2
Total	18	

Πίνακας 5: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 11MS023 και αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου, καθώς και μορίων ύδατος.



Σχήμα 32: Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 11MS023 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και τα μόρια ύδατος.

Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης
C01	Gly675 N
C02	Gly135 (C, CA, O) Leu136 N

C03	Asn484 ND2, His377 (CE1, ND1), Gly135 (O, C)
O04	His377 (CG, CE1), Val455 (CG1, CG2), Asn484 CG, Leu139 CD2
O05	Leu136 (CA, CB, N), His377 ND1, Gly135 C
N07	Asn284 ND2
N08	Leu136 CB
N09	Asn284 (OD1, CG, N, ND2)
C10	Asn284 (ND2, CG, OD1), His377 CB
C11	Asp339 OD1, Asn284 OD1, Thr378 CG2
N12	Asn284 CA
C13	Ala383 (O, CB), Phe285 N, Asn284 (C, CA, OD1, N)
C14	Ala383 (O, CB), Phe285 (O,C,CA,N), Asn284 (C,CA, N)
C15	His341 NE2, Phe285 (N, O)
N16	His341 CE1
C17	Asp339 OD1, His341 (CE1, NE2)
O18	His341 CE1, Asp339 CG, Leu136 CD1
O19	Phe285 C, His341 NE2
O20	Asn284 (OD1, CG), His377 (O,C, CB), Asn284 ND2
C21	Glu672 OE1, His377 O
O23	Asn484 ND2, Gly675 (O, CA, C), Ser674 (C, CB)
C24	Ser674 N, Gly675 N, Glu672 OE1, His377 O
O25	Ala673 (N, C, CB, CA), Glu672 (C, CG, CD), Ser674 (C, CA), Gly675 CA
Σύνολο	91

Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης 11MS023 και αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου

Βιβλιογραφία

Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.* D66, 213-221.

Ago-Elghar, G.E., Fujiyoshi, P. and Matsumura F. (2004). Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in hitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 743–752

Brunger, A.T. (1992). Free R-value-a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.

CCP4 (1994). The CCP4 (Collaborative Computational project Number 4 suite: Programmes for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.

Cohen E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* **57**, 946-950.

Corbett, J.R. (1974). *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, Academic Press, London, New York

Corbett, J.R., Wright, K. and Baillie, A.C. (1984). *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, 2nd edition, Academic Press, London, Orlando, San Diego, San Francisco, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, São Paulo.

Δημόπουλος, Β. (1998). *Φυτοπροστατευτικά προϊόντα*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα,

Emsley, P.; Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2004, 60, (Pt 12 Pt 1), 2126-2132.

Fischer, E. H. & Krebs, E. G., (1962). Muscle Phosphorylase B. In *Methods of Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.), Vol. 5, pp. 369-373, Academic Press, San Diego.

- Fiske C. H. & Subbarow Y. (1925). The colometric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400.
- W. L. DeLano. *The PyMol Molecular Visualization System*, Sa Carlos, CA, USA, 2002
- Hassall, K.A. (1990). *The Biochemistry and Uses of Pesticides. Structure, Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection*. 2nd Edition, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Jaguar, version 7.0, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2008.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. (1993). PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291.
- Leatherbarrow, R. J. (1990). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *TIBS15*, 455-458.
- Melpidou A. E. and Oikonomakos N. G. (1983). Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase a. *FEBS Lett.* **154**, 105-110.
- Merritt, E.A., and D.J. Bacon, D.J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* **277**, 505-524.
- Oikonomakos, N.G., Melpidou, A.E., and Johnson, L.N. (1985). Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 248-256.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G., and Johnson, L.N. (2000). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* **8**, 575-584.
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M.N., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., C. Tiraidis, Bischler, N., Tsitsanou, K.E., Zographos, S.E., Kostas, I.D. and Eisenbrand, G. (2006). Indirubin and indigo analogues, as potential inhibitors of glycogenolysis: structural basis of glycogen phosphorylase inhibition. In *Indirubin, the red shade of indigo*, Edited by L. Meijer, N. Guyard, L. Skaltsounis and G. Eisenbrand, Editions "Life in Progress", Station Biologique, Roscoff, France, Chapter 18, pp. 177-189.

- Oikonomakos, N.G. and Somsák, L. (2008). Recent advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9, 379-395
- Otwinowski Z, Minor W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
- Patrick, K.G. (2001). An Introduction to Medicinal Chemistry. 2nd Edition, Oxford University Press, Oxford, New York
- Potterton E, McNicholas S, Krissinel E, Cowtan K, Noble M. (2002). The CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr.* D58, 1955-1957.
- Potterton L, McNicholas S, Krissinel E, Gruber J, Cowtan K, Emsley P, Murshudov GN, Cohen S, Perrakis A, Noble M. (2004). Development in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr.* D60, 2288-2294.
- Rhodes, G. (2000). Crystallography Made Crystal Clear. A guide for users of macromolecular models. 2nd edition, Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Saheki, S., Takeda, A. and Shimazu, T. (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal. Biochem.* 148, 277-281.
- Segel, L.H. (1975). Enzyme kinetics, Wiley interscience, New York.
- Structure-Based Drug Discovery. An Overview (2006). Edited by Roderick E. Hubbard, RSC Publishing.
- Structure-Based Drug Discovery. (2007) Edited by Harren Jhoti and Andrew Leach, Springer.
- Stryer, L. (1995). Biochemistry, Fourth Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Stryer, L. (1997). Βιοχημεία, Τόμος Δεύτερος, σελ. 1120-1144. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο