



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΥΡΙΑΚΗΣ ΕΥΘΥΜΙΟΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ
ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ C-β-D-ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**KINETIC AND CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES ON THE
BINDING OF C-β-D-GLUCOSE DERIVATIVES TO
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ C-β-D-ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΟΝΟΜΑ: ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ ΕΛΛΑΔΑ

ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ: ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ ΕΛΛΑΔΑ

Στη φίλη μου Μαρία Κορίτση...

To be aware of something that is not the projection of the known, there must be the elimination, through the understanding, of the process of the known

Jiddu Krishnamurti (1895-1986)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I.	Περίληψη.....	8
II.	Abstract	9
III.	Ευχαριστίες.....	10
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1	Σακχαρώδης διαβήτης	12
1.1.1	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	13
1.1.2	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	13
1.2	Ομοιόσταση της γλυκόζης.....	15
1.2.1	Ινσουλίνη-Ανοχή στην Ινσουλίνη.....	15
1.2.2	Γλυκαγόνη.....	16
1.2.3	Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου	16
1.3	Θεραπευτικοί στόχοι για τον ΣΔ2	19
1.4	Η Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.	20
1.5	Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	22
1.5.1	Το ενεργειακό πλεονέκτημα	23
1.5.2	Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης	23
1.5.2.1	Ο ρόλος της π-έλικας	25
1.5.3	Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	25
1.5.4	Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	28
1.5.4.1	Καταλυτικό κέντρο	28
1.5.4.2	Κέντρο αναστολής	29
1.5.4.3	Νέο αλλοστερικό κέντρο	29
1.5.4.4	Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης	30
1.5.4.5	Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου	30
1.5.4.6	Αλλοστερικό κέντρο	31
1.5.5	Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	31
1.5.5.1	Η αλλοστερική μετάπτωση στην GP	32
1.5.6	Η GP ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων.....	34
1.6	Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες-X	34
1.6.1	Η φύση των κρυστάλλων	36

1.6.2	Ανάπτυξη κρυστάλλων	36
1.6.3	Ακτίνες-X.....	38
1.6.4	Θεωρία περίθλασης ακτινών X από κρύσταλλο	39
1.6.5	Ο Νόμος του <i>Bragg</i>	40
1.6.6	Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας	41
1.6.7	Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου	42
1.6.8	Έλεγχος του δομικού μοντέλου-Διάγραμμα <i>Ramachandran</i>	43
1.7	Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	44
1.7.1	Αλλοστερισμός στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	45
1.7.2	Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	46
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
2.1	Αντιδραστήρια.....	50
2.2	Οργανολογία.....	51
2.3	Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	51
2.4	Στήλες υγρής χρωματογραφίας	51
2.5	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	52
2.6	Υγρή χρωματογραφία-Σύστημα <i>FPLC</i>	52
2.6.1	Χρωματογραφία συγγένειας	53
2.6.1.1	Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+}	54
2.6.1.2	Στήλη πρόσδεσης GST	55
2.6.1.3	Χρωστική Cibacron Blue F3G-A.....	55
2.6.2	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	56
2.6.2.1	Στήλη Resource Q.....	57
2.7	Αφαίρεση της ετικέτας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	58
2.7.1	Πρωτεάσες <i>TEV</i> και <i>3C</i>	58
2.8	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-Πηκτώματα.....	58
2.8.1	Χρώση πηκτώματος	61
2.9	Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος <i>Bradford</i>	61
2.10	Απομόνωση της <i>GP</i> από σκελετικούς μύες κονίκλων (<i>rmGPb</i>)	62
2.11	Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής <i>GP</i> (<i>hlGP</i>)	63
2.12	Απομόνωση της <i>rmPhK-γ-trunc</i>	66

2.13	Φωσφορυλίωση της <i>GP</i>	67
2.14	Φωσφορυλίωση της <i>rmGPb</i>	68
2.15	Φωσφορυλίωση και ποσοτικοποίηση της <i>hlGPb</i> με <i>SDS-PAGE</i>	69
2.16	Κινητικές μελέτες έναντι της <i>GP</i>	69
2.16.1	Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια	70
2.16.2	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου	71
2.16.3	Ενζυμικό διάλυμα	71
2.16.4	Διαλύματα υποστρωμάτων	72
2.16.5	Πειραματική διαδικασία	73
2.16.6	Ανάλυση κινητικών δεδομένων	74
2.17	Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	76
2.17.1	Ανάπτυξη κρυστάλλων της <i>rmGPb</i>	76
2.17.2	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων	77
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
3.1	Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών	81
3.1.1	Καθαρισμός και απομόνωση της <i>rmGP</i>	81
3.1.2	Καθαρισμός και απομόνωση της <i>hlGP</i>	81
3.1.3	Ποσοτικοποίηση της <i>hlGPα</i>	83
3.1.4	Καθαρισμός και απομόνωση της <i>rmPhK-γ-trunc</i>	85
3.2	Κινητικές μελέτες.....	86
3.2.1	Προσδιορισμός της K_i του <i>JL H270</i>	87
3.2.2	Προσδιορισμός της K_i του <i>KS252</i>	87
3.3	Κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα	87
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) αποτελεί μια από τις σοβαρότερες μεταβολικές διαταραχές των τελευταίων χρόνων με το ποσοστό των ασθενών να αυξάνεται συνεχώς και να ξεπερνά τις εκάστοτε προβλέψεις. Η *GP* (EC 2.4.1.1) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παράγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (*GIP*). Η *GIP* μετατρέπεται στα ηπατοκύτταρα σε ελεύθερη γλυκόζη ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Στους διαβητικούς ασθενείς η γλυκογονόλυση εξακολουθεί να αποτελεί μια σημαντική πηγή παραγωγής γλυκόζης παρότι τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένα. Η *GP* αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων για τη θεραπεία του ΣΔ2 [1-3]. Η *GP* υπάρχει σε δυο αλληλομετατροπούμενες μορφές, την *GPb*, που έχει χαμηλή δραστικότητα και χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα (*T*-στερεοδιαμόρφωση), και την *GPa* η οποία έχει υψηλή δραστικότητα και υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα (*R*-στερεοδιαμόρφωση) [4]. Η μετατροπή της *b* σε *a* γίνεται με φωσφορυλίωση στη *Ser-14* της *GPb* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*, EC 2.7.1.38) [5]. Η *GP* διαθέτει 6 γνωστές θέσεις σύνδεσης προσδετών εκ των οποίων το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών μελετών. Η πλειοψηφία αυτών εστιάζεται στο σχεδιασμό αναλογών γλυκόζης με βάση την τρισδιάστατη δομή του ένζυμου με χρήση κατάλληλων λογισμικών ώστε να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου [6]. Σε αυτή την εργασία διεξήχθη αρχικά απομόνωση της *GP* από κονίκλους (*rmGP*) και των πρωτεϊνών: ανθρωπινή ηπατική *GP* (*hlGP*) και της γ -καταλυτικής υπομονάδας της *PhK* (*PhK- γ -trun*), από μετασχηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα *AKTA-FPLC*. Μελετήσαμε την επίδραση *C- β -D* γλυκοκυρανόζυλο τριαζολίων στη δραστικότητα της *rmGPa* και ο πλέον βιοδραστικός αναστολέας μελετήθηκε επίσης και στην *hlGPa*. Οι *rmGPa* και *hlGPa* προήρθαν με φωσφορυλίωση από την *PhK- γ -trun*. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της *rmGPb* για κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση της πρόσδεσης των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο, καθώς και στην ανάδειξη των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τους **KS252** και **JL H270** έναντι της *rmGPa* ήταν 660 μM και 3.39 μM αντίστοιχα ενώ η σταθερά αναστολής για τον **JL H 270** έναντι της *hlGPa* ήταν 5.28 μM . Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών των σταθερών αναστολής σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του βρόχου 280s στην κλειστή διαμόρφωση και με μια μετατόπιση της καρβοξυλομάδας του καταλοίπου *Glu282* που επάγεται από την πρόσδεση του **KS252** η οποία διαταράσσει την αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι οι αναστολείς *C- β -D* γλυκοκυρανόζυλο τριαζολίων, αποτελούν υποσχόμενους αναστολείς για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

II. Abstract

*Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is one of the most common and serious metabolic disorders that have been reported in the past decades. The number of the patients with T2DM keeps rising and even exceeds the predictions. In the last years, glycogen phosphorylase (GP), has been validated as a pharmaceutical target for the development of new anti-hyperglycaemic agents for T2DM treatment [1-3, 7]. GP is a key enzyme involved in glycogen metabolism by catalyzing the first step of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (G1P). G1P in hepatic cells is converted to free glucose to cover the energy needs. In T2DM, glycogenolysis increases the blood glucose levels even more. GP exists in two forms, GPb with low activity and affinity for substrate (T-state) and GPa with high activity and affinity for substrate (R-state) [4]. The conversion of the b to a form is achieved by phosphorylation of Ser-14 of GPb, by glycogen phosphorylase kinase (PhK, EC 2.7.1.38) [5]. GP has at least 6 regulatory sites with the catalytic site being the most well studied site for drug design. The majority of these studies use the 3D structure of GP to design new anti hyperglycaemic agents [6]. In this study, firstly, we isolated and purified GPb from rabbit muscle (rmGPb), human liver GPb (hlGPb), and the γ -catalytic subunit of rabbit muscle PhK via recombinant bacteria using the automated ÄKTA-FPLC system. We assessed the inhibitory potency of C- β -D-glucopyranosyl triazoles against rmGPa while the most bio-active compound was also tested with hlGPa. rmGPa and hlGPa were produced by phosphorylation with Phk- γ -trun. Subsequently we grew crystals of rmGPb for X-ray crystallography analysis. Structural analysis revealed that these inhibitors bind on the catalytic site of the enzyme. The K_i values measured for the inhibitors **KS252** and **JL H 270** at 660 μ M and 3.39 μ M respectively against rmGPa. **JL H270** also inhibited hlGPa with a K_i value of 5.28 μ M. X-ray crystallography analysis revealed that the difference between the K_i values of the two inhibitors lies in the stabilization of the 280s loop at an inactive form. Furthermore the binding of **KS252** results to a disturbance in the architecture of the catalytic site expressed by a shift on the carboxyl group of residue Glu282. These results highlight that C- β -D-glucopyranosyl triazoles are promising inhibitors for glycogen phosphorylase.*

III. Ευχαριστίες

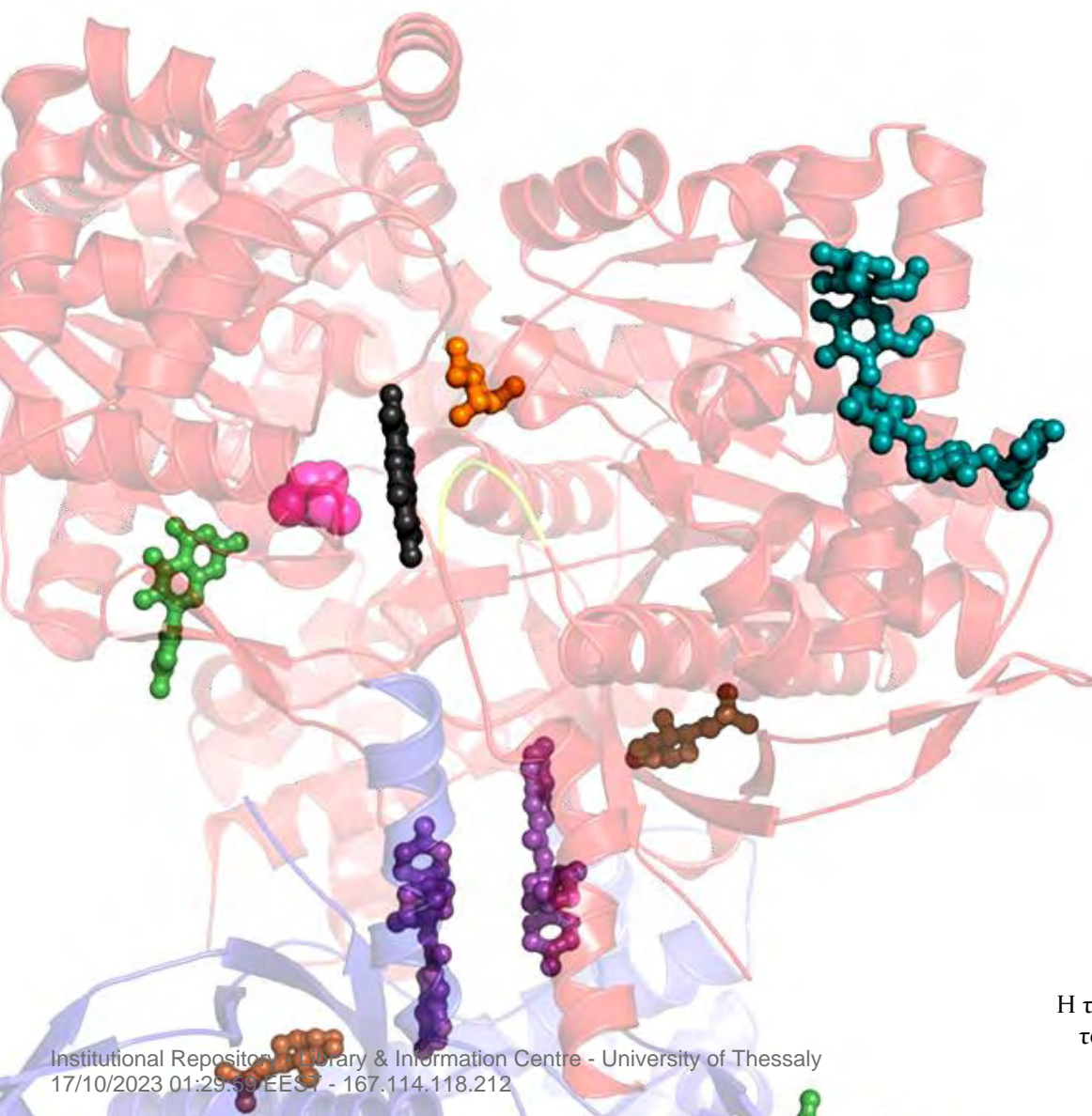
Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Σεπτέμβριο του 2014 έως τον Σεπτέμβριο του 2016. Ευχαριστώ θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του TBB, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα για την επίβλεψή του και για την δυνατότητα που μου έδωσε να βελτιώσω και να επεκτείνω το επιστημονικό μου υπόβαθρο. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την επιμονή, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς εκτός από της γνώσεις που μου προσέφερε με βοήθησε να ανακαλύψω και να βελτιώσω διάφορες πτυχές του χαρακτήρα μου. Για την περάτωση της παρούσας εργασίας θέλω να ευχαριστήσω την λέκτορα βιοχημείας-μεταβολισμού του TBB, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να ασχοληθεί και να με βοηθήσει σε καθημερινά ζητήματα που συναντήσαμε στην παρούσα εργασία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και την επίκουρο καθηγήτρια πρωτεϊνικής χημείας του TBB, Δρ. Μαρία Κοντού για την προσφορά της συνεργασίας της καθώς και τους επίκουρους καθηγητές Βιοχημείας του TBB, Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό και Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον καθηγητή βιολογίας δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης, Κωνσταντίνο Σακκά, ο οποίος ήταν αυτός που πρώτος με προέτρεψε να ασχοληθώ με τις βιοεπιστήμες.

Είναι γνωστό ότι η συνύπαρξη πολλών ατόμων σε χώρους εργασίας με γρήγορους και απαιτητικούς ρυθμούς απαιτεί την κατανόηση και τον αλληλοσεβασμό από όλους. Έτσι λοιπόν θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας τα οποία είτε μέσω της προσφοράς βοήθειας, είτε μέσω του ευχάριστου κλίματος που δημιουργήσαν βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδρόμο καθώς ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να προβληματιστεί μαζί μου για πάρα πολλά ζητήματα εντός και εκτός του εργαστηρίου. Θέλω να εκφράσω και την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου καθώς η γενναιόδωρη προσφορά της βοήθειας της και η ψυχολογική ενθάρρυνση που προσέφερε υπήρξε μείζονος σημασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Δρ Αναστασία Καντσάδη για την συνεργασία και την βοήθεια της. Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου από τους υποψήφιους διδάκτορες μέχρι τους προπτυχιακούς φοιτητές. Πιο συγκεκριμένα, τους υποψήφιους διδάκτορες Αθανάσιο Κυρίτη, Βύρωνα Γοργογιέτα, Παναγιώτη Μαραγκοζίδη, Ραφαηλία Μπέτα, Θεοδώρα Σολοβού, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρίνα Γιαννάκη και τους προπτυχιακούς φοιτητές Αναστασία Γκούσκου, Μαριλή Κοκολάκη και Μυρτώ Πατρασκάκη.

Εκτός του εργαστηρίου υπάρχουν άνθρωποι που με επαναπροσδιορίζουν. Αυτοί είναι οι φίλοι μου Αλέξανδρος Γραμματικόπουλος, Νίκος Γκουρνέλος, Μαρία Χαραλάμπους, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Παρασκευή Κυλινδρή, Κωνσταντίνος Τσιλαφάκης και Χαρά Ψαχούλα

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη τους καθώς χωρίς τη βοήθεια και την υπομονή τους δεν θα είχα καταφέρει να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών.

1. Εισαγωγή



Η τρισδιάστατη δομή της φωσφορυλάσης
του γλυκογόνου σε σύμπλοκο με διάφο-
ρους προσδέτες, PDB-ID: 4MRA

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Η πρώτη ολοκληρωμένη και ξεκάθαρη περιγραφή για τον σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) δόθηκε από το Αρεταίο της Καππαδοκίας ο οποίος ήταν φημισμένος ιατρός την ύστερης Ελληνιστικής περιόδου. Ο Αρεταίος ήταν αυτός που εισήγαγε πρώτος στην ιατρική ορολογία τον όρο “διαβήτης” που προέρχεται από το ρήμα “διαβαίνω”, διότι τα υγρά που προσλαμβάνονται από τον ασθενή λόγω της πολυδιψίας, δεν παραμένουν στο σώμα του, λόγω της πολυουρίας, αλλά το χρησιμοποιούν ως δοχείο για να διαφύγουν. Το όνομα του Αρεταίου έχει συνδεθεί με τον σακχαρώδη διαβήτη όσο κανενός άλλου, με τα κείμενα του να διακρίνονται για το μεγάλο εύρος γνώσεων, την ευθυκρισία και την ακρίβεια της συγγραφής [8]. Τα τελευταία χρόνια γίνονται συνεχώς εκτιμήσεις σχετικά με τον πληθυσμό που αναμένεται να νοσήσει από σακχαρώδη διαβήτη μέσα στις επόμενες δεκαετίες. Όμως, είναι εξαιρετικά ανησυχητικό πως παρότι οι προβλέψεις αυξάνονται συνεχώς, φαίνεται πως τελικά το ποσοστό των ανθρώπων που καταλήγει να νοσήσει τις ξεπερνά. Το 2013 έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι και ο αριθμός αυτός αναμένεται να ανέλθει στα 592 εκατομμύρια έως το 2035 σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη (*International Diabetes Federation, IDF*) [9].

Στην Ευρώπη υπάρχει μεγάλη διακύμανση ως προς τις αιτίες εκδήλωσης του σακχαρώδους διαβήτη επειδή επηρεάζεται από την αναλογία πολλών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ηλικία, η παχυσαρκία, η διατροφή, η άσκηση, η γενετική προδιάθεση ακόμα και οι διαταραχές στο κirkάδιο ρολόι που μπορούν να δημιουργήσουν δυσλειτουργία και απώλεια των β-κυττάρων του παγκρέατος από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη. Όμως, ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι συνθήκες διαβίωσης εμπλέκονται μεταξύ τους αλλά και με τους γενετικούς παράγοντες, οδηγώντας έτσι στον κίνδυνο εκδήλωσης σακχαρώδους διαβήτη, διαφέρει ακόμα και ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς [10, 11]. Ο διαβήτης είναι μια ασθένεια που μακροχρόνια μπορεί να προκαλέσει πολλές επιπλοκές, όπως είναι η υπέρταση, ανωμαλίες στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, αμφιβληστροειδοπάθεια με ενδεχόμενη απώλεια της όρασης, νεφροπάθεια, εμφάνιση διαβητικών ελκών στα πόδια και ακρωτηριασμούς, οστεοαρθροπάθειες, αυτοάνοση νευροπάθεια που μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερικά, καρδιαγγειακά προβλήματα καθώς και σεξουαλική δυσλειτουργία. Οι διαβητικοί ασθενείς έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής αθηροσκλήρωσης, και κετοξέωσης. Επομένως, είναι φανερό ότι η έγκαιρη διάγνωση είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση της νόσου μιας και ένα μεγάλο ποσοστό των διαβητικών νοσεί χωρίς να έχει διαγνωσθεί. Τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη είναι συνήθως η υπεργλυκαιμία, η πολυουρία, η πολυδιψία, η απώλεια βάρους, κι ορισμένες φορές η πολυφαγία και η θολή όραση [12]. Ο ΣΔ διακρίνεται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και το διαβήτη της κύησης. Εκτός από αυτές τις κατηγορίες υπάρχουν και κάποιες ειδικές κατηγορίες διαβήτη, όπως είναι η γενετήσια έλλειψη των β-παγκρεατικών κυττάρων, μολύνσεις, ενδοκρinoπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος, διαβήτη επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά κ.α. [13].

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

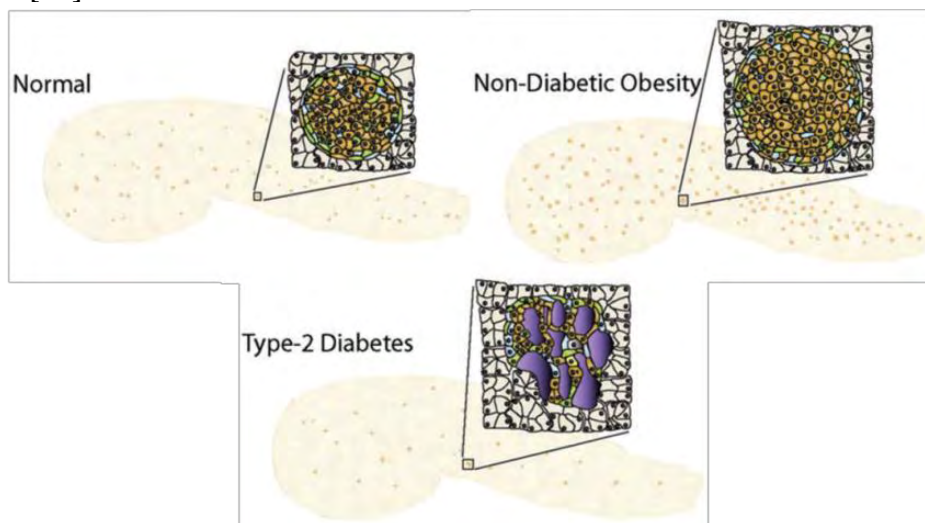
Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (ΣΔ1) ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Ο ρυθμός με τον οποίο τα β παγκρεατικά κύτταρα καταστρέφονται διαφέρει ανάμεσα στους ασθενείς και μπορεί να είναι από ραγδαίος (κυρίως στα παιδιά) έως αργός (κυρίως σε ενήλικες). Στους περισσότερους ασθενείς ανιχνεύονται αυτο-αντισώματα έναντι των β-κυττάρων του παγκρέατος και καταλήγουν τελικά στη χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης για να επιζήσουν, αν και πάλι υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης κετοξέωσης [13]. Στη διαβητική κετοξέωση η χαμηλή συγκέντρωση ινσουλίνης σε συνδυασμό με αύξηση των επίπεδων των κατεχολαμινών, της κορτιζόλης και της αυξητικής ορμόνης οδηγούν στην ενεργοποίηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης που προκαλεί διάσπαση των τριacycloγλυκερόλων και απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στο ήπαρ σε κετονοσώματα τα οποία απελευθερώνονται στη κυκλοφορία. Η εμφάνιση της διαβητικής κετοξέωσης γίνεται όταν υπάρχει υπερπαραγωγή της γλυκόζης και των κετονών στο ήπαρ ως αποτέλεσμα της μεταβολής στην ισορροπία της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης. Ο συνδυασμός της αυξημένης παραγωγής ηπατικής γλυκόζης και η μειωμένη περιφερειακή χρήση της γλυκόζης είναι η κύρια παθολογική διαταραχή που ευθύνεται για την διαβητική κετοξέωση [14]. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με διαβήτη τύπου 1 φαίνεται να σχετίζονται με κάποια διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν έχουν όλοι οι ασθενείς αυτά τα χαρακτηριστικά. Αυτό, οδηγεί στην προτεινόμενη ταξινόμηση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 σε δύο (υπό)-τύπους: τον 1A και τον 1B. Ο τύπος 1A (αυτοάνοσος), περιλαμβάνει το 70 % - 90 % των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 που έχουν αυτο-αντισώματα ενώ ο τύπος 1B (ιδιοπαθής) αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο ποσοστό των ασθενών για τους οποίους τα αίτια της παθογένειας της ασθένειας μένουν ασαφή [13, 15].

Τα αίτια εκδήλωσης ΣΔ1 μπορούν να ποικίλουν ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η εύρεση εξατομικευμένης θεραπείας. Το 2006 οι *Shinya Yamanaka* και *Kazutoshi Takahashi* κατάφεραν να παράγουν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (*iPS cells*) από ινοβλάστες εμβρύων και ενήλικων ποντικών [16]. Ο *Shinya Yamanaka* βραβεύτηκε για αυτή την έρευνα με το βραβείο νόμπελ φυσιολογίας το 2012. Το 2009 οι *Rene Maehr et al.*, προχώρησαν ένα βήμα παραπέρα. Κατέφεραν να κατευθύνουν την διαφοροποίηση ανθρώπινων *iPS* κυττάρων από ινοβλάστες προς κύτταρα που είχαν τη δυνατότητα να παράγουν ινσουλίνη και ανταποκρίνονται στη γλυκόζη. Η επέκταση της προσέγγισης αυτής για όλους τους τύπους των κυττάρων που εμπλέκονται στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 θα μπορούσε να οδηγήσει στην κατανόηση των αιτιών της νόσου αλλά και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών και προληπτικών και θεραπευτικών στρατηγικών [17].

1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (ΣΔ2) ή αλλιώς μη ινσουλινοεξαρτώμενος, οφείλεται στην ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η μειωμένη ευαισθησία προς την ινσουλίνη αναφέρεται συχνά ως ανοχή στην ινσουλίνη. Ο ΣΔ2, σε αντίθεση με τον ΣΔ1, σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα (υπερινσουλιναμία), κάτι το οποίο οφείλεται στην αντίρροπη απάντηση των β παγκρεατικών κυττάρων,

ώστε να μειωθεί η ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης [18]. Έτσι λοιπόν, ο ΣΔ2 εμφανίζεται όταν το πάγκρεας αποτυγχάνει να εκκρίνει την απαραίτητη ινσουλίνη που απαιτεί ο μεταβολισμός, λόγω επίκτητης εκκριτικής δυσλειτουργίας των β-παγκρεατικών κυττάρων ή λόγω μείωσης της μάζας τους. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν η εκκριτική δυσλειτουργία των β-κυττάρων για την ινσουλίνη αποτελεί αίτιο ή συνέπεια της νόσου, όμως υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι μπορεί να οφείλεται σε συμπτωματική αλλαγή στη μάζα των β-κυττάρων του παγκρέατος. Στην *Εικόνα 1* φαίνεται η μορφολογία του παγκρέατος μεταξύ φυσιολογικών, μη-διαβητικών παχύσαρκων ανθρώπων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [19].



Εικόνα 1: Μορφολογία του παγκρέατος ενηλίκων ατόμων σε φυσιολογικούς ανθρώπους, μη διαβητικούς παχύσαρκους ανθρώπους και σε ασθενείς με ΣΔ2. Το πάγκρεας το οποίο αποτελείται κυρίως από εξωκρινή κύτταρα διατηρεί το σχήμα και το μέγεθος του και στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις. Οι νησίδες (που εκκρίνουν ινσουλίνη) σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται διεσπαρμένες σε όλο το πάγκρεας και αποτελούν περίπου το 1% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του παγκρέατος. Στις φυσιολογικές νησίδες τα β-κύτταρα (καφέ χρώμα) τείνουν να εντοπίζονται στον πυρήνα των νησίδων και αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% των ενδοκρινικών κυττάρων των νησίδων. Σε μη διαβητικούς παχύσαρκους ανθρώπους οι νησίδες τείνουν να αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος κυρίως λόγω της αύξησης του αριθμού των β-κυττάρων ανά νησίδα ή σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της αύξησης του μεγέθους των β-κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, το 90% των νησίδων των ενδοκρινικών κυττάρων είναι β-κύτταρα. Στον ΣΔ2 ο αριθμός των νησίδων στο πάγκρεας μπορεί να μειωθεί και οι νησίδες τείνουν να αποδιοργανώνονται και να παραμορφώνονται. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη μείωση του αριθμού των β-κυττάρων ανά νησίδα και οι αμυλοειδείς πλάκες (μωβ) μπορούν να κυριαρχήσουν στην περιοχή της νησίδας [19]

Η αδυναμία των β-παγκρεατικών κυττάρων να παράγουν την απαραίτητη ινσουλίνη ενδέχεται να οφείλεται σε σημαντική αύξηση της απόπτωσης των β-κυττάρων που πιθανότατα επάγεται από την χρόνια υπεργλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία και/ή από ορισμένες κυτοκίνες που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για την φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση των β-παγκρεατικών κυττάρων. Το αποτέλεσμα, είναι μια μείωση στην λειτουργική μάζα των β-κυττάρων του παγκρέατος στον ΣΔ2 [19]. Στην *Εικόνα 1* παρατηρούμε επίσης τη δημιουργία αμυλοειδών πλακών στο πάγκρεας διαβητικών ασθενών, κάτι το οποίο οφείλεται στο σχηματισμό ινιδίων από την ινσουλίνη. Αποθέσεις αμυλοειδών έχουν παρατηρηθεί επίσης σε σημεία όπου έχει γίνει υποδόρια χορήγηση ινσουλίνης και μετά από επαναλαμβανόμενες ενέσεις ινσουλίνης [20].

1.2 Ομοιόσταση της γλυκόζης

Το ήπαρ συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα ώστε να περιορίζεται σε ένα εύρος και να ρυθμίζεται στο κατώτερο όριο, με τις ανεπιθύμητες επιδράσεις της υπογλυκαιμίας, και στο ανώτερο όριο με τη δυνατότητα απώλειας στα ούρα, αν το νεφρικό κατώτατο όριο έχει υπερβεί. Μετά από ένα γεύμα που περιέχει υδατάνθρακες, ένα ποσοστό της γλυκόζης οξειδώνεται και ένα άλλο μετατρέπεται σε γλυκογόνο για χρήση ως καύσιμο σε συνθήκες νηστείας. Η γλυκόζη που περισσεύει μετατρέπεται μερικώς από το ήπαρ σε λιπαρά οξέα και τριάκυλογλυκερόλες τα οποία στη συνέχεια ενσωματώνονται στην πολύ χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλη (*Very Low Density Lipoprotein, VLDL*) και μεταφέρονται στις αποθήκες του λιπώδους ιστού. Σε κατάσταση νηστείας, η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα διατηρείται από τη διάσπαση του γλυκογόνου στο ήπαρ βραχυπρόθεσμα, όσο διαρκούν οι αποθήκες γλυκογόνου, και στη συνέχεια με τη γλυκονεογένεση που λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ αλλά και στους νεφρούς. Οι ορμόνες που σχετίζονται με την ομοιόσταση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη, η αυξητική ορμόνη, η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη με την ινσουλίνη να αποτελεί την μόνη ορμόνη που μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ενώ οι υπόλοιπες ορμόνες τείνουν γενικά να ανταγωνίζονται τις δράσεις της ινσουλίνης [21].

1.2.1 Ινσουλίνη-Ανοχή στην Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη, που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, συντίθεται αρχικά ως ανεργό μόριο, την προϊνσουλίνη, η οποία στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση ώστε να αφαιρεθεί ένα πεπτίδιο και να προκύψει η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που αποτελείται από δύο αλυσίδες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Προκειμένου η ινσουλίνη να επιφέρει το βιολογικό της αποτέλεσμα πρέπει να συνδεθεί στον υποδοχέα της ο οποίος είναι ένα διμερές δύο πανομοιότυπων υπομονάδων. Κάθε μονάδα αποτελείται από μία α και μια β αλυσίδα συνδεδεμένες μεταξύ τους με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Κάθε α-υπομονάδα βρίσκεται τελείως εξωτερικά του κυττάρου και περιέχει την περιοχή σύνδεσης της ινσουλίνης, ενώ κάθε β-υπομονάδα βρίσκεται κυρίως στην εσωτερική πλευρά του κυττάρου, διαπερνώντας τη μεμβράνη με ένα και μόνο διαμεμβρανικό τμήμα. Το ενδοκυτταρικό τμήμα της β υπομονάδας περιέχει μια επικράτεια με δράση κινάσης τυροσίνης. Η σύνδεση της ινσουλίνης στην α-υπομονάδα οδηγεί στη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης που βρίσκονται στις β-υπομονάδες. Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί σε μετατροπή της κινάσης στην ενεργό της διαμόρφωση. Έτσι, αρχίζει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταφορέων της γλυκόζης (*GLUT4*) στην μεμβράνη του κυττάρου, καθώς και σε πρωτεϊνοσύνθεση και κυτταρική ανάπτυξη [4, 22]. Η εμφάνιση ανοχής στην ινσουλίνη και η μείωση του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι σταδιακά αναπτυσσόμενες καταστάσεις, που αρχίζουν με την αύξηση του σωματικού βάρους και την παχυσαρκία αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους η παχυσαρκία οδηγεί σε ανοχή στην ινσουλίνη δεν είναι ακόμα εντελώς ξεκάθαροι [18]. Όμως, φαίνεται ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο *TNF-α* και η *IL-6* που σχετίζονται με την παχυσαρκία, μπορούν να παρεμποδίσουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η μετατόπιση του μεταφορέα της γλυκόζης *GLUT4* στη μεμβράνη του κυττάρου [23]. Η ανοχή στην ινσουλίνη αποτελεί μέρος μιας σειράς διαταραχών που συχνά καλείται “με-

ταβολικό σύνδρομο”. Κατά την παρατεταμένη και έντονη ανοχή στην ινσουλίνη ακόμα και τα αυξημένα επίπεδα της ινσουλίνης δεν επαρκούν για τη διατήρηση του μεταβολισμού της γλυκόζης στα φυσιολογικά επίπεδα. Έτσι, στα πρώιμα στάδια της νόσου παρατηρείται μετρίου βαθμού υπεργλυκαιμία μετά την πέψη υδατανθράκων. Στα επόμενα στάδια του ΣΔ2 ακολουθεί “εξάντληση” των β-παγκρεατικών κυττάρων, τα οποία δεν μπορούν να συνθέσουν αρκετή ινσουλίνη ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση σοβαρής υπεργλυκαιμίας, ιδιαίτερα μετά τη λήψη γεύματος πλούσιο σε υδατάνθρακες [18].

Για την αντιμετώπιση του ΣΔ2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενου) χρησιμοποιείται σήμερα ένας διγλουανιδικός παράγοντας που ονομάζεται μετφορμίνη. Η ιδιότητα της μετφορμίνης να μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης δεν οφείλεται σε διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης αλλά κυρίως στην αύξηση της αξιοποίησης της γλυκόζης από τα κύτταρα. Η μετφορμίνη στους περιφερειακούς ιστούς αυξάνει την ινσουλينو-επαγόμενη πρόσληψη γλυκόζης. Επιπλέον, η μετφορμίνη αυξάνει την αξιοποίηση της γλυκόζης από το έντερο και παρέχει προστασία έναντι της υπογλυκαιμίας καθιστώντας την έτσι ένα αντι-υπεργλυκαιμικό φάρμακο [24].

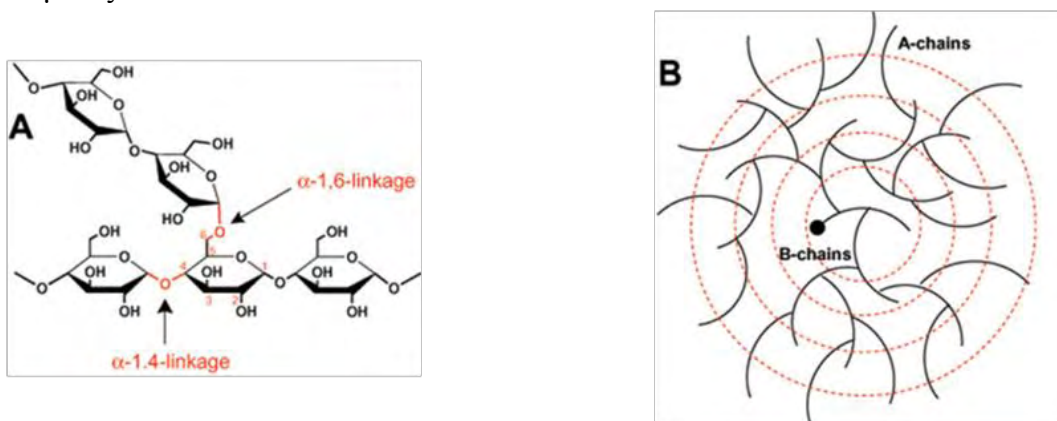
1.2.2 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησίδων του παγκρέατος ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα της γλυκόζης του αίματος σε κατάσταση νηστείας, σε αντίθεση με την ινσουλίνη η οποία σηματοδοτεί την κατάσταση σιτιστικής επάρκειας. Χρησιμεύει για να κινητοποιεί τα απόθεμα του γλυκογόνου όταν δεν υπάρχει πρόσληψη γλυκόζης από τις τροφές. Το κύριο όργανο-στόχος δράσης της γλυκαγόνης είναι το ήπαρ [4]. Η σύνδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της οδηγεί σε ένα καταρράκτη γεγονότων που ξεκινάει με την παραγωγή κυκλικού *AMP* (*cAMP*) και καταλήγουν στη διαδοχική ενεργοποίηση των ενζύμων πρωτεϊνική κινάση Α (*PKA*), κινάση της φωσφορυλάσης (*PhK*) και φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) με το τελευταίο ενζυμο να επιφέρει αύξηση της γλυκογονόλυσης. Επιπλέον η *PKA* και η *PhK* φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν την συνθάση του γλυκογόνου όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3* [25]. Η αύξηση των αμινοξέων του αίματος και η μυϊκή άσκηση διεγείρουν την έκκριση της γλυκαγόνης ενώ η αυξημένη γλυκόζη στο αίμα αναστέλλει την έκκριση της [18].

1.2.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Τον πρώτο αιώνα της ανακάλυψης του, το γλυκογόνο εικαζόταν ότι αποτελεί ένα υλικό που έμοιαζε με το άμυλο αλλά είχε μια απροσδιόριστη σύσταση και αποτελούσε τον πρόγονο του σακχάρου που παράγεται από το ήπαρ. Αργότερα το γλυκογόνο αναγνωρίστηκε ως ένα υπόστρωμα του οποίου τα μόρια μπορούν να διασπαστούν με ενζυμική δράση [26]. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι το γλυκογόνο είναι ένα πολυμερές γλυκόζης που λειτουργεί ως μέσω αποθήκευσης της γλυκόζης στα κύτταρα, σε περιόδους διατροφικής αφθονίας, ώστε να την χρησιμοποιηθεί όταν η προσλαμβανόμενη γλυκόζη δεν επαρκεί. Το γλυκογόνο υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς, από τα βακτήρια και τα αρχαία, έως και τον άνθρωπο. Τα φυτά συνθέτουν παρόμοια πολυμερή γλυκόζης με την μορφή αμύλου το οποίο αποτελείται από αμυλοπεκτίνη, που είναι ένας πολυσακχαρίτης χημικά παρόμοιος με το γλυκογόνο, και από την αμυλόζη η οποία είναι ένα μη διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης. Ο πρωταρχικός πολυμερισμός του γλυκογόνου παρέχε-

ται από α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών της γλυκόζης και στη συνέχεια εισάγονται διακλαδώσεις από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς όπως φαίνεται στις Εικόνα 2 και 4. Το μοντέλο της δομής του γλυκογόνου κατηγοριοποιεί τις αλυσίδες ως εσωτερικές B-αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν συνήθως δύο διακλαδώσεις, και ως εξωτερικές A-αλυσίδες, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες.

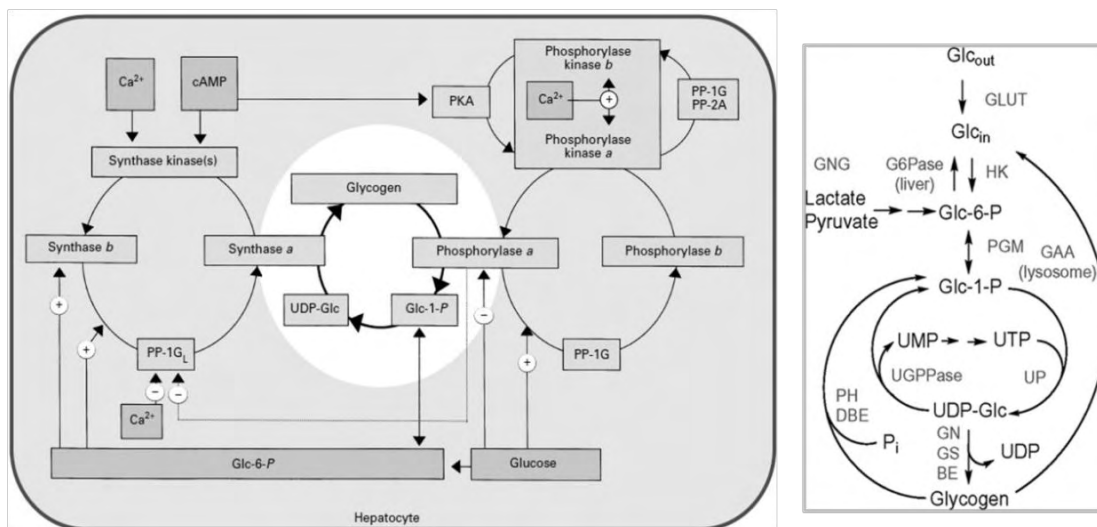


Εικόνα 2: (Α) Παρατηρούνται οι α -1,4 και α -1,6-γλυκοζιτικοί δεσμοί. (Β) Η οργάνωση του γλυκογόνου σε εσωτερικές β-αλυσίδες που φέρουν κατά μέσο όρο δύο διακλαδώσεις και εξωτερικές α-αλυσίδες χωρίς διακλαδώσεις. Η μαύρη κουκίδα δηλώνει τη θέση της γλυκογονίνης [27].

Για την σύνθεση του γλυκογόνου, αρχικά, γίνεται πρόσληψη της εξωκυττάριας γλυκόζης από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης. Στη συνέχεια, μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από το ένζυμο εξοκινάση και στη συνέχεια σε 1-φωσφορική γλυκόζη από τη φωσφογλυκομουτάση. Στο σημείο αυτό την σκυτάλη αναλαμβάνει η πυροφωσφορυλάση της *UDP*-γλυκόζης η οποία μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 5'-ουριδινοδιφωσφορική (*UDP*)-γλυκόζη, εις βάρος της μετατροπής του *UTP* σε *UDP*. Έπειτα δρα η γλυκογονίνη-I ώστε να σχηματιστεί μια μικρή αλυσίδα πολυμερούς γλυκόζης. Η γλυκογονίνη αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες 37 kDa, κάθε μια από τις οποίες περιέχει έναν ολιγοσακχαρίτη αποτελούμενο από γλυκόζες με δεσμούς α -1,4. Κάθε υπομονάδα γλυκογονίνης καταλύει την προσθήκη 8 μονάδων γλυκόζης στη συνέχεια της στο διμερές της. Η *UDP* γλυκόζη είναι ο δότης στην αυτογλυκοζυλίωση αυτή. Η γλυκογονίνη μέσω του μεγάλου της καρβοξυτελικού άκρου αλληλεπιδρά απευθείας με τη συνθάση του γλυκογόνου η οποία είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του γλυκογόνου σχηματίζοντας τους α -1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς χρησιμοποιώντας την *UDP* γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου.

Η συνθάση του γλυκογόνου στους ευκαρυώτες ενεργοποιείται αλλοστερικά από την 6-φωσφορική γλυκόζη και ρυθμίζεται αρνητικά με ομοιοπολική φωσφορυλίωση. Η παρουσία της 6-φωσφορικής γλυκόζης υπερνικά την απενεργοποίηση που οφείλεται στη φωσφορυλίωση και το ένζυμο μπορεί να επανακτήσει πλήρως την δραστηριότητα του. Έτσι, η δράση αυτών των ενζύμων οδηγεί τελικά στη σύνθεση του πολυμερούς γλυκογόνου. Στην αντίστροφη πορεία, δηλαδή κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου, αρχικά έχουμε τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου που οδηγούν στην παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (βλ., εδάφιο 1.5). Έπειτα η φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει, αντιθέτως αυτή τη φορά, την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη η οποία στη συνέχεια μπο-

ρεί να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία ή να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη και ανόργανο φώσφορο μέσω αποφωσφορυλίωσης ώστε να εξέλθει του κυττάρου [4, 27, 28].



Εικόνα 3: Επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. PKA πρωτεϊνική κινάση A, Glc-1-P 1-φωσφορική γλυκόζη, Glc-6-P 6-φωσφορική γλυκόζη, UDP-Glc UDP γλυκόζη, Glc_{out} εξωκυτταρική γλυκόζη, Glc_{in} ενδοκυτταρική γλυκόζη, HK εξοκινάση, G6Pase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, PGM φωσφογλυκομουτάση, UP φωσφορυλάση της UDP γλυκόζης, UGPPase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, GN γλυκογονίνη, GS συνθάση του γλυκογόνου, BE ένζυμο διακλάδωσης, PH φωσφορυλάση του γλυκογόνου, DBE ένζυμο αποδιακλάδωσης, GAA λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση, GNG γλυκονεογένεση [25, 27].

Για να ολοκληρωθεί η σύνθεση του πολυμερούς του γλυκογόνου αλλά και για να επιτευχθεί η διάσπαση του και να παραχθεί γλυκόζη, απαιτείται και η συμμετοχή άλλων ενζύμων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4:

- Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP):

Η GP καταλύει την διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου (τα άκρα με μια ελεύθερη υδροξυλική ομάδα στον άνθρακα 4). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται φωσφορόλυση, μιας και η φωσφορυλάση χρησιμοποιεί ορθο-φωσφορικά για την διάσπαση του υποστρώματος της και για την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P). Η διαδικασία της φωσφορόλυσης πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η φωσφορυλάση διασπά α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς στους κλάδους του γλυκογόνου. Στα σημεία των διακλαδώσεων όπου υπάρχουν α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί, η φωσφορυλάση σταματά την διάσπαση των α-1,4 δεσμών όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης. Η συνέχιση της δράσης της φωσφορυλάσης γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου [4]. Έλλειψη της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου V ή αλλιώς ασθένεια *McArdle*, ενώ έλλειψη του ενζύμου της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου VI ή αλλιώς ασθένεια *Hers* [29].

- Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (GDE):

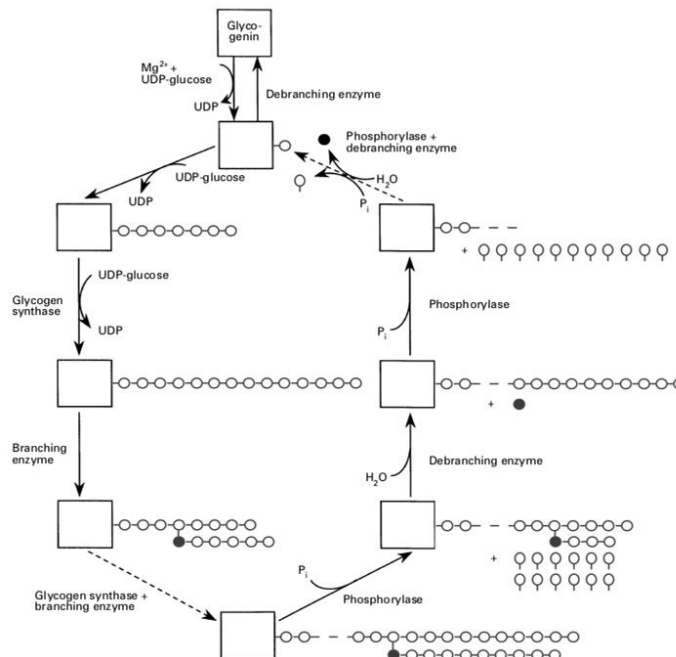
Όταν η φωσφορυλάση του γλυκογόνου φτάσει τέσσερα κατάλοιπα από μια διακλάδωση στο μόριο του γλυκογόνου, τότε δεν μπορεί να συνεχίσει τη διάσπαση α -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών. Για να μπορέσει η φωσφορυλάση να συνεχίσει τη διάσπαση του γλυκογόνου χρειάζονται δύο επιπλέον ένζυμα, μια μεταφοράση και μια α -1,6 γλυκοζιτάση. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μία εξωτερική διακλάδωση σε μία άλλη. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6. Η α -1,6 γλυκοζιτάση, γνωστή επίσης και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6. Ένα μόριο γλυκόζης απελευθερώνεται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση. Έτσι, τα δύο αυτά ένζυμα μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση. Στους ευκαρυώτες η δραστηριότητα της μεταφοράσης και της α -1,6 γλυκοζιτάσης συνυπάρχουν σε μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα 160 KDa και αποτελεί ένα παράδειγμα διλειτουργικού ενζύμου [4]. Έλλειψη του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου οδηγεί σε νόσο αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου III [29].

- Ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου (GBE):

Η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει μόνο τη σύνθεση των α -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών. Όμως, για να γίνει το γλυκογόνο ένα διακλαδισμένο πολυμερές απαιτείται ένα ένζυμο για την δημιουργία των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου. Ο σχηματισμός των διακλαδώσεων αυξάνει τη διαλυτότητα του γλυκογόνου και δημιουργεί ένα μεγάλο αριθμό τελικών καταλοίπων, τα οποία είναι θέσεις δράσης της φωσφορυλάσης και της συνθάσης του γλυκογόνου. Έτσι, ο σχηματισμός διακλαδώσεων αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου [4]. Έλλειψη του ενζύμου διακλάδωσης του γλυκογόνου οδηγεί σε νόσο αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου IV ή αλλιώς ασθένεια Andersen [29].

1.3 Θεραπευτικοί στόχοι για τον ΣΔ2

Διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες έχουν προγράμματα που σχετίζονται με ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων που απευθύνονται σε νέους ηπατικούς στόχους. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (GR), ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης ή της γλυκογονόλυσης (κινάσης της φωσφορυλάσης και φωσφορυλάση) και η γλυκοκινάση. Στην *Εικόνα 6* αποτυπώνονται οι ηπατικοί στόχοι που βρίσκονται σε επίκεντρο των προγραμμάτων ανακάλυψης νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων και ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν και ρυθμίζεται η δράση τους (συνοψίζονται στην ανασκόπηση [7])



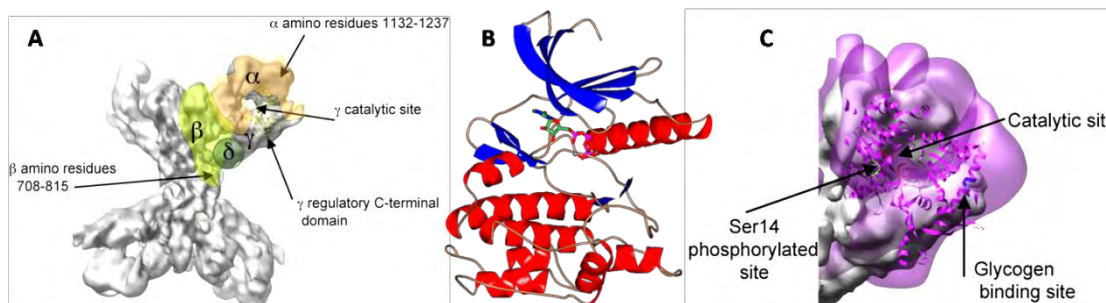
Εικόνα 4: Τα στάδια της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου [25].

1.4 Η Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες είναι ένζυμα τα οποία ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά γεγονότα μέσω διαδικασιών που ονομάζονται φωσφορυλίωση και απο-φωσφορυλίωση αντίστοιχα. Οι διαδικασίες αυτές είναι αντιστρεπτές και μεταβάλλουν τη βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών μέσω ρύθμισης της δομής τους ή/και της δραστηρότητας τους. Όλες οι γνωστές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν ένα κοινό δομικό πρότυπο στο οποίο οφείλεται η ικανότητα της κατάλυσης. Παρά το κοινό αυτό δομικό πρότυπο, κάθε κινάση έχει εξειδίκευση για συγκεκριμένο υπόστρωμα και η ρύθμιση για κάθε μια μπορεί να σχετίζεται με διάφορες πρωτεΐνες [5]. Οι κινάσες είναι *ATP*-εξαρτώμενες φωσφοτρανσφεράσες που καταλύουν την αντίστροφη φωσφορυλίωση σε υδροξυλομάδες ($-OH$) των καταλοίπων *Ser*, *Tyr* και *Thr* συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων. Οι πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται στο στόχαστρο των φαρμακευτικών προγραμμάτων μιας και η αναστολή μιας πρωτεϊνικής κινάσης μπορεί να αναστείλει σηματοδοτικά μονοπάτια που ευθύνονται για ασθένειες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το *Imatinib*, το οποίο είναι ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης. Το *Imatinib* είναι αναστολέας της κινάσης *BCR-ABL*, η οποία είναι μια ογκογόνος πρωτεϊνική κινάση χίμαιρα που αποτελεί προϊόν του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια και προκαλεί χρόνια μυελογενή λευχαιμία (*CML*) [30].

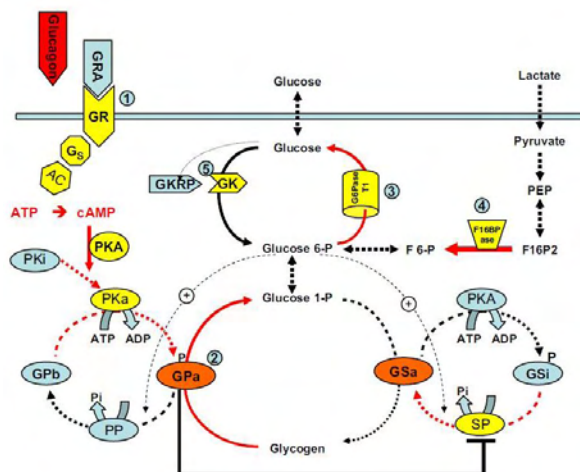
Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*, *EC 2.7.1.38*) είναι το ένζυμο που ανταποκρίνεται σε ορμονικά σήματα, ώστε να ενεργοποιήσει την γλυκογονόλυση, μέσω φωσφορυλίωσης και μετατροπής της *GPh*, που είναι ανενεργή, στην ενεργή μορφή *GPa* (βλ. εδάφιο 1.2.2). Το ολοένζυμο της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι ένα δεκαεξαμερές με στοιχειομετρική υπομονάδα $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ η οποία έχει μια δομή που μοιάζει με πεταλούδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, και μοριακό βάρος περίπου 1.3×10^3 *KDa*. Οι υπομονάδες α -, β - και δ - είναι ρυθμιστικές, ενώ η γ - είναι η καταλυτική. Μελέτες σύνδεσης (*docking*) έδειξαν ότι στην άκρη των λοβών

βρίσκεται η καταλυτική γ -υπομονάδα η οποία είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της *GP* στην *Ser14* του N-τελικού της άκρου [5, 31].



Εικόνα 5: **A)** Σχηματική απεικόνιση του ολοενζύμου της *PhK* όπου φαίνονται οι τοποθεσίες των τεσσάρων υπομονάδων του ενζύμου από μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της *PhK* (Εικόνα από τους [31]). **B)** 3D δομή της *PhK-glycine* σε σύμπλοκο με το *ATP* (πράσινο) και δύο Mg^{2+} (γκρι) (PDB-ID: 1PHK,[5]). **C)** Απεικόνιση του τρισδιάστατου χάρτη κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της *PhK* με το μονομερές του υποστρώματος της, δηλαδή την *GP*. Η *Ser14* παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα, το κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου με μπλε και το καταλυτικό κέντρο με κόκκινο (Εικόνα από τους [31]).

Η κίνηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βρίσκεται στο στόχαστρο για την εύρεση μορίων τα οποία θα μπορούν να αναστέλλουν την δράση της και άρα την ενεργοποίηση της *GPa*. Πρόσφατα, η μελέτη των *Begum J.*, και συνεργατών έδειξε ότι ανάλογα ινδουрубίνης μπορούν να οδηγήσουν σε αναστολή της *PhK* με τον αναστολέα *indirubin-3'-acetoxime* να αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα της μελέτης με IC_{50} 170 nM [32].



Εικόνα 6: Ηπατικοί στόχοι για αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα: (1) Ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (*GR*): Η πρόσδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (*AC*). Το *cAMP* ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση *A* (*PKA*) η οποία μετατρέπει την κινάση της φωσφορυλάσης (*PK*) από μία μη ενεργή (i) σε μια ενεργή (a) κατάσταση. Η *PhK* ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) μετατρέποντας μέσω με φωσφορυλίωσης την μη ενεργή μορφή της (*GPb*) στην ενεργή της μορφή (*GPa*). Η αντίθετη διαδικασία καταλύεται από τη φωσφατάση της φωσφορυλάσης. (2) Η *GPa* καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία μετατρέπεται σε 6 φωσφορική γλυκόζη και έπειτα σε γλυκόζη μέσω της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης. (3) Η γλυκονεογένεση από το γαλακτικό και άλλους 3-καρβονικούς (ανθρακικούς) προγόνους αποτελεί μια εναλλακτική πηγή 6-φωσφορικής γλυκόζης. (4) Η φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (*F16BPase*) καταλύει την προτελευταία αντίδραση στη γλυκονεογένεση αποδίδοντας 6-φωσφορική γλυκόζη. (5) Σε υψηλές συγκεντρώσεις η γλυκόζη προκαλεί ενεργοποίηση της γλυκοκινάσης (*GK*) μέσω διάσπασης της ανασταλτικής της πρωτεΐνης (*GKRP*). Η *GK* καταλύει τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ένας πρόδρομο μόριο (πρόγονος) του γλυκογόνου, ενεργοποιεί τη συνθήση του γλυκογόνου και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου προωθώντας την αποφωσφορυλίωση της *GSI* και της *GPa* [7].

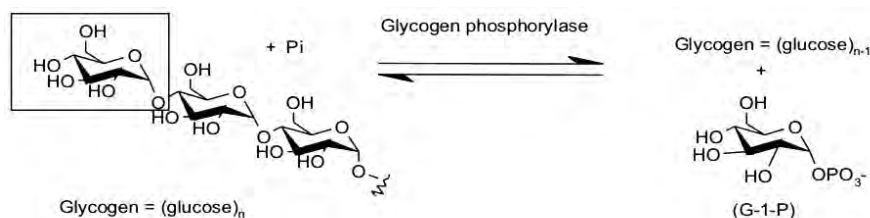
Η *PhK* ενεργοποιείται από την *PKA* με φωσφορυλίωση στη β-υπομονάδα της. Επιπλέον η *PhK* μπορεί να ενεργοποιηθεί εν μέρει, από επίπεδα Ca^{2+} της τάξεως του 10^{-6} M. Η υπομονάδα δ είναι η ασβεστιοτροποποιητίνη, ένας αισθητήρας ασβεστίου που διεγείρει πολλά ένζυμα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης είναι σημαντικός για τους μυς, όπου το έναυσμα της σύσπασης τους είναι η απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η *PhK* έχει μέγιστη δραστικότητα μόνο ύστερα από φωσφορυλίωση της υπομονάδα β και ενεργοποίηση της υπομονάδας δ με δέσμευση Ca^{2+} [4].

1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*, *EC 2.4.1.1*) είναι το πλέον μελετημένο ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί μοριακό στόχο για την εύρεση φαρμάκων με σκοπό τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II [1]. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο καταλύει την προσθήκη φωσφορικού οξέος στον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ δύο μονομερών του μορίου του γλυκογόνου. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή της 1-φωσφορικής γλυκόζης και του γλυκογόνου με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 7* [3]. Η φωσφορολυτική διάσπαση των α-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών προχωρά από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου και η φωσφορυλάση συνεχίζει τη διάσπαση μέχρι το τέταρτο κατάλοιπο από το σημείο διακλάδωσης. Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρέψιμη *in vitro* και ο λόγος της ισορροπίας των συγκεντρώσεων [1-φωσφορική γλυκόζη]/[*Pi*] είναι 0.28 σε pH 6.8. Ωστόσο, *in vivo* το ένζυμο λειτουργεί μόνο κατά την πορεία της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου επειδή μέσα στο κύτταρο η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από αυτή της 1-φωσφορικής γλυκόζης [33].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ανακαλύφθηκε το 1936 από το ζεύγος *Cori* και σύντομα οι μελέτες τους έδειξαν ότι η δραστικότητα της, ή η αποδιοργάνωση του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης, όπως αναφέρθηκε τότε, επηρεάζεται από την παρουσία νουκλεοτιδίων, με το *AMP* να οδηγεί σε ενίσχυση αυτής της δράσης [34, 35]. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η μυϊκή, η ηπατική και του εγκεφάλου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που ακολουθεί το μοντέλο των *Monod*, *Wyman* και *Changeaux* και βρίσκεται πάντοτε σε δύο μορφές, μία ενεργή, *R*, με υψηλή αγγιστεία για υποστρώματα και τροποποιητές και μια ανενεργή, *T*, με χαμηλή αγγιστεία για υποστρώματα και τροποποιητές οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Ο φυσιολογικός ρόλος της μυϊκής φωσφορυλάσης, η οποία βρίσκεται ανενεργή, είναι να παρέχει ενέργεια στους μύες κατά τη συστολή καθώς γίνεται η μετάπτωση της από την *T*- στην *R*- στερεοδιαμόρφωση παρουσία του *AMP* [36]. Η ηπατική φωσφορυλάση βρέθηκε αρχικά στο ήπαρ αλλά βρίσκεται παντού εκτός από τον εγκέφαλο, τους σκελετικούς μύες, και τα μυοκύτταρα της καρδιάς. Αυτή η ισομορφή της φωσφορυλάσης έχει ομοιοστατικό ρόλο καθώς ρυθμίζει την παραγωγή γλυκόζης. Σε συνθήκες περίσσειας γλυκόζης η πρόσδεση της στην *GPa* μετατοπίζει την αλλοστερική ισορροπία από την ενεργό μορφή *R* στην ανενεργό μορφή *T*. Η αλλαγή αυτή καθιστά την φωσφορική ομάδα στη *Ser₁₄* ένα εύκολα προσβάσιμο υπόστρωμα για την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (*PPI*) οδηγώντας έτσι σε απενεργοποίηση του ενζύμου. Επομένως, η *GPa* αποτελεί έναν αισθητήρα γλυκόζης για το κύτταρο [4]. Η φωσφορυλάση του εγκεφάλου (*BGP*),

της οποίας η δομή ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα από τους *Mathieu C.*, και συνεργάτες (2016), εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον ιστό του εγκεφάλου και στα μυοκύτταρα της καρδιάς. Εφόσον η *BGP* υπάρχει στον καρδιακό μυ, η αυξημένη συγκέντρωση της φωσφορυλάσης στο πλάσμα του αίματος κατά την ισχαιμία δείχνει ότι η *BGP* θα μπορούσε να αποτελεί έναν δείκτη για τις οξείες στεφανιαίες νόσους [37, 38].



Εικόνα 7: Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου [3].

Οι περισσότερες μελέτες για την εύρεση αναστολέων έναντι της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχουν γίνει χρησιμοποιώντας την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κονίκλους (*rmGP*). Ωστόσο με βάση την αμινοξική αλληλουχία η *rmGP* έχει 97 % ομολογία με την ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση (*hmGP*). Επιπλέον, τα τρία ισοένζυμα που υπάρχουν στον άνθρωπο μοιράζονται μεταξύ τους 80-83 % ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία ενώ μεταξύ της *rmGP* και της ηπατικής φωσφορυλάσης (*hlGP*) δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και στα αλλοστερικά κέντρα. Όπως έχει δειχθεί πρόσφατα [39] αναστολείς που σχεδιάζονται και παράγονται με βάση τη δομή της *rmGP* αναστέλλουν και την *hlGP* η οποία είναι ο φαρμακευτικός στόχος. Εκτός όμως από τη φωσφορυλάση των θηλαστικών υπάρχουν και σε άλλους οργανισμούς ένζυμα που καταλύουν αντίδραση φωσφορόλυσης, όπως είναι η πατάτα, η *E. coli*, και η ζύμη [36].

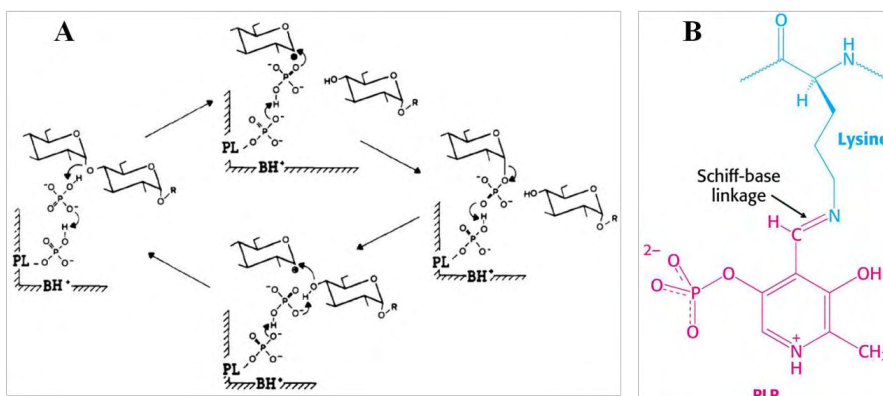
1.5.1 Το ενεργειακό πλεονέκτημα

Επειδή το σάκχαρο που προκύπτει από την αντίδραση της φωσφορυλάσης είναι φωσφορυλιωμένο δεν χρειάζεται επιπλέον φωσφορυλίωση για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία, κάτι που θα γινόταν αν το ένζυμο κατέλυε υδρολυτική διάσπαση. Σε μια τέτοια περίπτωση θα προέκυπτε γλυκόζη η οποία θα χρειαζόταν να φωσφορυλιωθεί, καταναλώνοντας ένα μόριο *ATP*, για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Επομένως η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά έναντι της υδρολυτικής διάσπασης. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της παραγωγής 1-φωσφορικής γλυκόζης έναντι της παραγωγής γλυκόζης, είναι ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες η 1-φωσφορική γλυκόζη ιονίζεται μέσα στα κύτταρα των μυών και δεν μπορεί να διαχυθεί προς το εξωτερικό του κυττάρου [4].

1.5.2 Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με σκοπό την εξοικονόμηση του *ATP* που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Επομένως, για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται ο αποκλεισμός του νερού από το ενεργό κέντρο. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προ-

ϊόν, 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 β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν (οξοκαρβονιόν), όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [4].



Εικόνα 8: **A)** Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η *PLP* συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το σχήμα της αντίδρασης δείχνει την αντιστρεψιμότητα της φωσφορύλωσης των ολιγοσακχαριτών (*R*) παρουσία ορθοφωσφορικού (πάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης (κάτω μισό). *PL* = πυριδοξάλη, *BH⁺* = πρωτονιώμενη γενική βάση που προσφέρεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο [40]. **B)** Δεσμός βάσης *Schiff* που σχηματίζει η *PLP*. Η *PLP* (κόκκινο χρώμα) σχηματίζει μια βάση *Schiff* με την λυσίνη 680 (μπλε χρώμα) στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [4].

Η φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και είναι απαραίτητος συμπράγοντας για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η αλδεϋδική ομάδα της *PLP* συνδέεται με δεσμό βάσης *Schiff* με τη λυσίνη 680 (*Lys680*), όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, όπου αναλύεται η συμμετοχή της *PLP* στην αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b*. Η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* λειτουργεί υπό μορφή διαιονόντος ως δότης/δέκτης πρωτονίων σύμφωνα με το γενικό σχήμα της οξεοβασικής κατάλυσης. Όταν η αντίδραση προχωράει τα εμπρός (φωσφορύλωση α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού), το πρώτο βήμα είναι η πρωτονίωση του οξυγόνου του γλυκοζιδίου από ορθοφωσφορικό. Το οξοκαρβονίδιο που σχηματίζεται σταθεροποιείται από το φωσφορικό ανιόν. Η επακόλουθη ομοιοπολική πρόσδεση του φωσφορικού οδηγεί στο σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Όταν η αντίδραση συμβαίνει προς την αντίθετη κατεύθυνση (σύνθεση των ολιγοσακχαριτών) η πρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της 1-φωσφορικής γλυκόζης αποσταθεροποιεί το γλυκοζιτικό δεσμό και αυτό ευνοεί το σχηματισμό του ζεύγους γλυκοζυλοοξοκαρβονικό ιόν με το φωσφορικό ανιόν. Το φωσφορικό ανιόν διευκολύνει ουσιαστικά την πυρηνόφιλη προσβολή του τελευταίου κατ'απολείπου του γλυκοζιδίου στο καρβονικό ιόν. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων οδηγεί στο σχηματισμό του α -1,4-γλυκοζιτικού δεσμού και στην αύξηση του αριθμού των γλυκοζιτικών κατ'απολείπων στον αρχικό ολιγοσακχαρίτη. Η φωσφορική ομάδα της *PLP* και του υποστρώματος προσεγγίζουν η μία την άλλη σε απόσταση ενός δεσμού υδρογόνου με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτή η μεταφορά πρωτονίων και έτσι η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* να λειτουργεί ως μεταφο-

ρέας πρωτονίων που επαναφορτίζει το φωσφορικό ανιόν του υποστρώματος [33, 40]. Στην *T*-στερεοδιαμόρφωση της *GPb* η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* βρίσκεται με τη μορφή του μονοϊόντος και το ένζυμο έχει χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα ενώ κατά την μετάπτωση στην *R*-στερεοδιαμόρφωση η κατάσταση του ιονισμού μεταβάλλεται από μονοϊόν σε δυανιόν και το ένζυμο αποκτά μεγάλη συγγένεια για το υπόστρωμα [41].

1.5.2.1 Ο ρόλος της π-έλικας

Η ευκαμψία της λυσίνης 680 είναι χωρικά περιορισμένη λόγω του ότι βρίσκεται στο εσωτερικό του ενεργού κέντρου, όμως φαίνεται να υπάρχει μια επιπλέον, μάλλον ειδική, αλληλεπίδραση με μία π-έλικα της φωσφορυλάσης. Μελέτες που έγιναν στην δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* (*PDB-ID: 1PYG*) έδειξαν ότι αυτή η π-έλικα (κατάλοιπα 488-494) της *GPb* βρίσκεται αρκετά κοντά στη *Lys680*. Η *Trp691*, που αποτελεί μέρος αυτής της π-έλικας, βρίσκεται ακριβώς πάνω από τη *Lys680* και φαίνεται να δημιουργείται μεταξύ τους μια επιφάνεια αλληλεπιδράσεων *Van der Waals*. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε σταθεροποίηση της θέσης της *Lys680-PLP* με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτή η αλληλεπίδραση της 5' φωσφορικής ομάδας της *PLP* με την ορθοφωσφορική ομάδα του υποστρώματος [42].

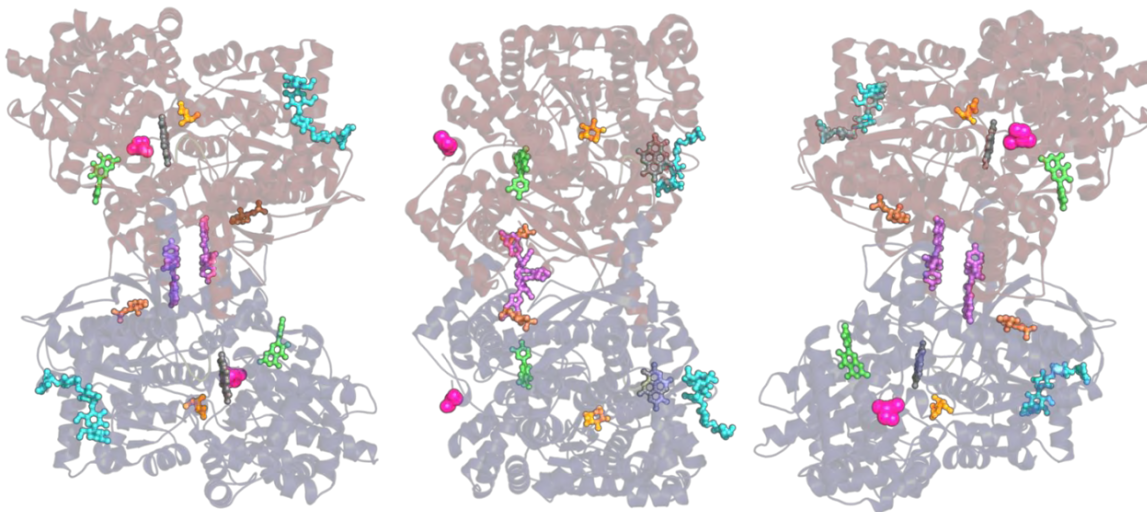
1.5.3 Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια διμερής α-β πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες με το μοριακό βάρος της κάθε υπομονάδας να είναι 97.4 *KDa* (842 κατάλοιπα). Η φωσφορική πυριδοξάλη προσδένεται σε κάθε υπομονάδα μέσω μιας βάσης *Schiff* με τη *Lys680*. Οι μελέτες των *Barford & Johnson* έδειξαν πως οι κρύσταλλοι της *GP* περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48 %), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [43]. Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της *GP* έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60 x 60 x 55 Å. Η *GP* αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 καταλοίπων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 καταλοίπων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 κατάλοιπα. Υπάρχει μια περιοχή 95 καταλοίπων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 καταλοίπων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των καταλοίπων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα κατάλοιπα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (*cap*) και πύργος (*tower*) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280s (κατάλοιπα 280-292) και το N-τελικό άκρο (κατάλοιπα 1-18) [44].

Στην *Εικόνα 9* απεικονίζεται η δομή της μυικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μαζί με διάφορους προσδέτες στις ρυθμιστικές περιοχές ενώ στην *Εικόνα 11* ένα σχηματικό διάγραμμα

του μονομερούς της. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει τουλάχιστον επτά ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες είναι:

- Η θέση αναγνώρισης για την φωσφοσερίνη 14
- Το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης όπου προσδένεται το *AMP* [45].
- Το καταλυτικό κέντρο όπου προσδένεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη [46].
- Το κέντρο της αποθήκευσης του γλυκογόνου [47].
- Το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη και σχετικές ενώσεις, το οποίο απέχει 12 Å από το καταλυτικό κέντρο [48].
- Το νέο αλλοστερικό κέντρο που αποτελεί θέση πρόσδεσης του πιθανού αντιδιαβητικού φαρμάκου *CP320626* [44].
- Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, το οποίο αποτελεί το πλέον πρόσφατο κέντρο που ανακαλύφθηκε [49].



Εικόνα 9: Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: καταλυτικό (1H5U ή 1C50), κέντρο αναστολής (4YUA), κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (1P2B), νέο αλλοστερικό κέντρο (1H5U), κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (4MRA), αλλοστερικό κέντρο (1GPY), βρόχος 280S και η Ser14. [44, 49-52]

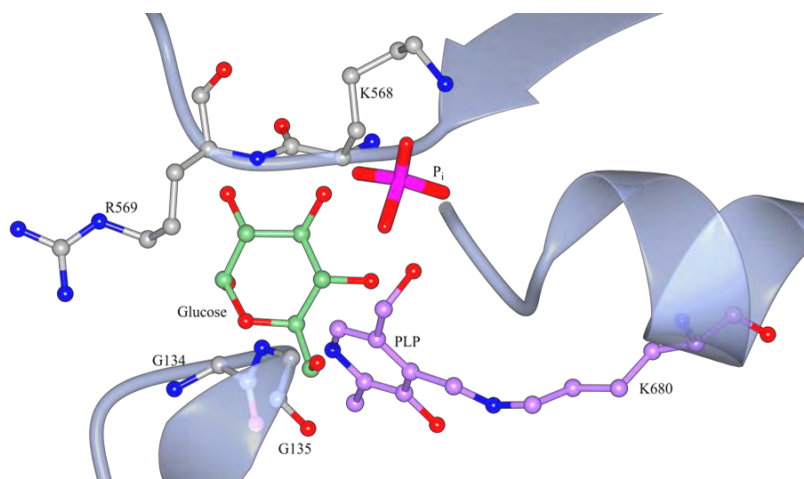
Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου αναδιπλώνεται σχηματίζοντας δυο επικράτειες: την επικράτεια 1 (κατάλοιπα 1-484) και την επικράτεια 2 (485-842) [43]. Η επικράτεια 2 περιέχει την ομοιοπολικά προσδεδεμένη φωσφορική πυριδοξάλη και ένα μέρος του ενεργού κέντρου ενώ η επικράτεια 1 που σχηματίζει το σύνολο της περιοχής της διεπαφής των 2 υπομονάδων, μέσω της οποίας μεταφέρονται αλλαγές στη διαμόρφωση μεταξύ των δύο υπομονάδων, περιλαμβάνει το κέντρο σύνδεσης του *ATP/AMP*, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, ένα μέρος του ενεργού κέντρου και το κέντρο της φωσφορυλιωμένης *Ser14*. Το κέντρο αναστολής μοιράζεται επίσης μεταξύ των δύο επικρατειών της *GP* [53], όπως και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [49]. Το ένζυμο εκτός από τη θέση αναγνώρισης της 5'-φωσφορικής ομάδας της *PLP* διαθέτει 3 επιπλέον κέντρα αναγνώρισης ορθοφωσφορικών ιόντων, τα οποία είναι:

- Κέντρο πρόσδεσης του υποστρώματος
- Κέντρο πρόσδεσης του *AMP*, σε απόσταση περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο.

- Κέντρο της φωσφο-σερίνης (*Ser14*), σε απόσταση περίπου 12 Å από το κέντρο πρόσδεσης του *AMP*.

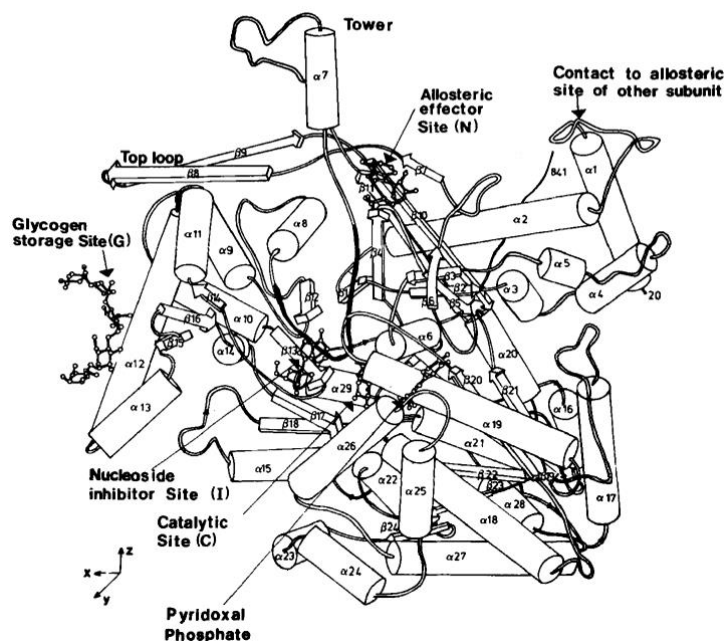
[43]

Η θέση αναγνώρισης του υποστρώματος των ορθοφωσφορικών ιόντων βρέθηκε από τους *Oikonomakos N.G.*, και συνεργάτες σε σύμπλοκο με γλυκόζη, *PLP* και *IMP*, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 10*. Το ορθοφωσφορικό ιόν προσδένεται πολύ κοντά στην περιοχή που βρίσκεται η 5' φωσφορική ομάδα της *PLP*, στη φυσιολογική δομή, αλλά όχι στην ίδια ακριβώς θέση. Η απόσταση μεταξύ των δυο ορθοφωσφορικών ιόντων είναι περίπου 1.2 Å [54]. Κοντά στην περιοχή αυτή, εκτός από το ορθοφωσφορικό ιόν, έχει παρατηρηθεί η πρόσδεση ενός θειικού ιόντος. Σε μελέτες που έγιναν με κρυστάλλους στην *R*-στερεοδιαμόρφωση, λόγω παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης θειικού αμμωνίου, φάνηκε ότι υπάρχει ένα θειικό ιόν στο καταλυτικό κέντρο. Οι κρύσταλλοι της *GP* στην *R*-στερεοδιαμόρφωση τόσο για την *GPb* όσο και για την *GPa* έχουν προκύψει με 1.2 *M* θειικό αμμώνιο το οποίο ενεργοποιεί την *GPb*. Η ενεργοποίηση αυτή οφείλεται σε πρόσδεση του θειικού ιόντος στη θέση αναγνώρισης της φωσφο-*Ser14* [55]. Το κέντρο πρόσδεσης του θειικού ιόντος βρίσκεται περίπου 5 Å από την 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP*. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρουσία θειικών ιόντων σχηματίζει τετραμερή όπως φαίνεται στην *Εικόνα 13* [41].



Εικόνα 10: Η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος του ορθοφωσφορικού ιόντος, *PDB-ID: 2SKD* [54].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δυο αλληλομετατροπούμενες μορφές, τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b* (*GPb*), που έχει χαμηλή δραστητικότητα και χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα, και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a* (*GPa*) η οποία έχει υψηλή δραστητικότητα και υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα. Η *GPa* μπορεί να πάρει δύο διαφορετικές μορφές, την ανενεργή μορφή *T* και την ενεργή μορφή *R* [4]. Η μετατροπή της *GP* από την ανενεργή μορφή *b* στην ενεργή μορφή *a* γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης στη *Ser14* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, της οποίας η δραση και η ρυθμική αναφερθηκε στο *εδαφίο 1.4*. Η μετατροπή της *GPa* σε *GPb*, η οποία ενεργοποιείται από την ινσουλίνη, καταλύεται από τη φωσφατάση της φωσφορυλάσης [7, 25], όπως απεικονίζεται και στην *Εικόνα 6*.



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην έλικα α1, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της έλικας α2 και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της έλικας α8 μαζί με το βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Η PLP είναι εγκλωβισμένη στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένη με τη Lys680 της έλικας α21. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την GIP, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της έλικας α2 και της α8. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την έλικα α12 και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτιδία που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της έλικας α19. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου [56]

1.5.4 Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης αλληλεπιδρούν με διάφορους προσδέτες ελέγχοντας τη δράση του ενζύμου. Η πρόσδεση ενός προσδέτη σε μια ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του μετατοπίζοντας την ισορροπία μεταξύ των διαμορφώσεων T και R του ενζύμου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαθέτει τουλάχιστον επτά κέντρα πρόσδεσης, κάτι το οποίο αναδεικνύει την υψηλή ρύθμιση στην οποία υπόκειται η δράση της.

1.5.4.1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (βλ. Εικόνα 9), βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας μακριά από την περιοχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο υπομονάδων του λειτουργικού διμερούς, ωστόσο συνδέεται με αυτό μέσω του βρόχου 280s. Το κέντρο αυτό είναι θαμμένο σε απόσταση περίπου 15 Å από τον κύριο όγκο που καταλαμβάνει ο διαλύτης που βρίσκεται στη βάση μιας στενής διόδου, που σχηματίζεται από την επιφάνεια των δύο περιοχών της κάθε υπομονάδας, και κοντά στον απαραίτητο συμπαραγόντα φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) [57].

Η αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου έχει μελετηθεί από την πρόσδεση της γλυκόζης, η οποία και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε ως ένωση οδηγός για την παρασκευή αναλόγων γλυκόζης [46, 58-62]. Η σταθερά αναστολής της α -D-γλυκόζης και της β -D-γλυκόζης ως προς της GPb είναι 1.7 mM και 7.4 mM αντίστοιχα [58]. Η πρόσδεση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με τα κατάλοιπα His377, Glu672, Gly675, Asn484, Leu136, Asn284, Ala673, Ser674, Leu139, Val455, Gly135 καθώς και με ένα δίκτυο μορίων ύδατος, τα οποία δημιουργούν μια γέφυρα μεταξύ των ατόμων της γλυκόζης και των γειτονικών αμινοξέων. Από τα ανάλογα της γλυκόζης που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα ο πλέον βιοδραστικός αναστολέας για το καταλυτικό κέντρο της GP, είναι ο **8b**, με σταθερά αναστολής έναντι των *rmGa* και *hlGPa* ίση με 65 nM και 26 nM αντίστοιχα [39]. Η πιθανή αναστολή των αναλόγων της γλυκόζης οφείλεται στη μετακίνηση του βρόχου 280s στην κλειστή διαμόρφωση και στη σταθεροποίηση της T-στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου [1].

1.5.4.2 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής της GP βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση περίπου 12 Å από το καταλυτικό κέντρο (βλ. Εικόνα 9). Το κέντρο αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια εσοχή στο ένζυμο που σχηματίζεται μεταξύ της παράλληλης διάταξης των πλευρικών αλυσίδων δύο αρωματικών καταλοίπων, της Phe285 και της Tyr613. Ένα από τα πιο γνωστά μόρια που προσδένεται στο κέντρο αυτό είναι η καφεΐνη η οποία έχει μια σταθερά αναστολής 0.13 mM (GPb) και 0.17 mM (GPa) [48, 63]. Η σύνδεση του προσδέτη στο κέντρο αναστολής γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και των πλευρικών αλυσίδων των δύο αρωματικών καταλοίπων. Εκτός από τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, κάθε προσδέτης σχηματίζει ένα συγκεκριμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με μόρια ύδατος, τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους και με τα γειτονικά κατάλοιπα του κέντρου αναστολής. Ένας άλλος γνωστός προσδέτης του κέντρου αναστολής είναι η φλαβοπυριδόλη, η οποία είναι ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (αναστολέας της CDK2). Η φλαβοπυριδόλη δρα συνεργιστικά με την γλυκόζη σταθεροποιώντας την T-στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου με τη μετατόπιση του βρόχου 280s από τη διαμόρφωση που επιτρέπει την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο στην R-στερεοδιαμόρφωση σε μια που την αποκλείει [64].

1.5.4.3 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο ανακαλύφθηκε το 2000 από τους Oikonomakos και συνεργάτες [44] κατά την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης της χημικής ένωσης CP320626 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ο CP320626 προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο στην κεντρική κοιλότητα που υπάρχει μεταξύ των δύο υπομονάδων του ενζύμου και μέχρι την συγκεκριμένη εργασία δεν είχε γίνει ξανά αναφορά για σύνδεση κάποιο προσδέτη στο συγκεκριμένο κέντρο (βλ. Εικόνα 9). Η κεντρική κοιλότητα έχει μήκος περίπου 30 Å με μια ακτίνα που ποικίλει από ~4 Å έως ~8 Å και περικλείει έναν όγκο περίπου 1300 Å³. (Arg33, His34, Arg60, Asp61 και τα σχετικά συμμετρικά κατάλοιπα). Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται σε απόσταση 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστο-

λής. Η κοιλότητα είναι μερικώς κλειστή από τη μία πλευρά μέσω των αμινοξέων που σχηματίζουν το επικάλυμμα και τις έλικες α2 (*Arg33*, *His34*, *Arg60*, *Asp61* και τα αντίστοιχα συμμετρικά κατάλοιπα) και από την άλλη πλευρά από τις έλικες-πύργους (*Asn270*, *Glu273*, *Ser276* και τα αντίστοιχα συμμετρικά αμινοξέα) [65].

1.5.4.4 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (βλ. *Εικόνα 9*) ανακαλύφθηκε πρόσφατα από τους *Kantsadi A.L.*, και συνεργάτες σε μία μελέτη που αφορούσε τη διερεύνηση της ανασταλτικής δραστηριότητας 13 εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποίησης από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έδειξε ότι η κερσετίνη προσδένεται σε ένα κέντρο της πρωτεΐνης που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της, σε απόσταση 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αυτό σχηματίζεται από τα κατάλοιπα *Lys544*, *Arg551*, *Lys655* και *Tyr548* της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα *Glu120* και *Glu123* της N-τελικής περιοχής [49]. Η κερσετίνη αναστέλλει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου με IC_{50} 4.8 μM (*GPa*) και 20.9 μM (*Gpb*) αντίστοιχα [66].

Μελέτες στην *GP* έχουν δείξει ότι τα φυσικά φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν, σε σημαντικό βαθμό, την δραστηριότητα της *GP*, ωστόσο δεν έχει γίνει χαρακτηρισμός του προτύπου σύνδεσης τους στο ένζυμο. Όμως, λόγω της δομικής ομοιότητας με την φλαβοπυριδόλη, ενδέχεται να προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου [66]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ και το διμερές του, ελλαγικό οξύ, συνδέονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου με το ελλαγικό οξύ να εμφανίζει ισχυρή συνεργιστική δράση με την γλυκόζη. Το ελλαγικό οξύ αποτελεί τον πλέον φυσικό βιοδραστικό αναστολέα έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με σταθερά αναστολής 13.4 μM και 7.5 μM έναντι της *Gpb* και *GPa* αντίστοιχα [50].

1.5.4.5 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, σχετίζεται με την έλικα α12 και βρίσκεται στην επικράτεια 1 στην επιφάνεια της πρωτεΐνης σε απόσταση περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 50 Å από το νέο αλλοστερικό κέντρο (βλ. *Εικόνα 9*). Στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου εκτός από το γλυκογόνο προσδένονται ολιγοσακχαρίτες όπως η μαλτοεπτόζη και οι κυκλοδεξτρίνες [47, 51]. Οι διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει το κέντρο αποθήκης του γλυκογόνου δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές, ωστόσο γνωρίζουμε ότι το κέντρο αυτό τοποθετεί το ένζυμο στην επιφάνεια του γλυκογόνου και προάγει το σχηματισμό ενεργών διμερών του ενζύμου όταν προσδεθεί το γλυκογόνο ή κάποιος ολιγοσακχαρίτης. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου επηρεάζει επίσης και τη δραστηριότητα του ενζύμου αλλά δεν έχουν βρεθεί προς το παρόν ενώσεις που να αναστέλλουν σημαντικά το ένζυμο. Ωστόσο οι α-β- και γ- κυκλοδεξτρίνες, που συνδέονται στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, χαρακτηρίστηκαν ως μικτού τύπου συναγωνιστικοί αναστολείς (ως προς το γλυκογόνο) έναντι της *Gpb* με σταθερές αναστολής 47.1 mM , 14.1 mM και 7.4 mM αντίστοιχα [51].

1.5.4.6 Αλλοστερικό κέντρο

Οι δύο υπομονάδες του διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έρχονται κοντά σε δύο θέσεις οι οποίες βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του ενζύμου. Η μία επαφή σχηματίζεται από την διεπαφή της περιοχής του επικαλύμματος (κατάλοιπα 36 έως 47) της δεύτερης υπομονάδας και με το πτυχωτό φύλλο β7 και την έλικα α2 της πρώτης υπομονάδας, ενώ αντίστοιχα οι ίδιες επαφές σημειώνονται στο ενζύμο κατά τον δυαδικό άξονα συμμετρίας. Στη δεύτερη περιοχή αλληλεπίδρασης υπομονάδας-υπομονάδας εμπλέκεται η διεπαφή του πύργου και αποτελείται από την αντιπαράλληλη διάταξη των δυο συμμετρικών ελίκων α7 (κατάλοιπα 262-276). Το αλλοστερικό κέντρο (βλ. Εικόνα 9) είναι κλειστό από την περιοχή του επικαλύμματος και επενδεδυμένο από τις έλικες α2 και α8 και από το μικρό πτυχωτό φύλλο β7. Στο αλλοστερικό κέντρο έχουν βρεθεί να προσδένονται τα μόρια *AMP*, *IMP*, *ATP*, 6-φωσφορική γλυκόζη, *NADH*, *UDP*-γλυκόζη, ορθοφωσφορικά ιόντα, δηλαδή φωσφορυλιωμένοι παράγοντες [1]. Η *AMP* και η *IMP* ενεργοποιούν την *GPb* με την *AMP* να είναι ισχυρότερος ενεργοποιητής από την *IMP*. Αντίθετα η *ATP*, η 6-φωσφορική γλυκόζη και η *UDP*-γλυκόζη αναστέλλουν το ένζυμο σταθεροποιώντας το στην *T*-στερεοδιαμόρφωση, κάτι το οποίο δηλώνει ότι η μετάπτωση της *GPb* από την κατάσταση *T* στην κατάσταση *R* και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυοκυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η *GPb* είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της *ATP* και της 6-φωσφορικής γλυκόζης, έτσι σε μύες που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή *GPb*. Όταν αρχίζει η άσκηση η αυξημένη παραγωγή *AMP* ενεργοποιεί την *GPb* και παράλληλα απελευθερώνεται η ορμόνη που προκαλεί τη δημιουργία *GPa*. Η πρόσδεση της *AMP* στην *GPb* οδηγεί στο σχηματισμό τετραμερούς [1, 4, 45].

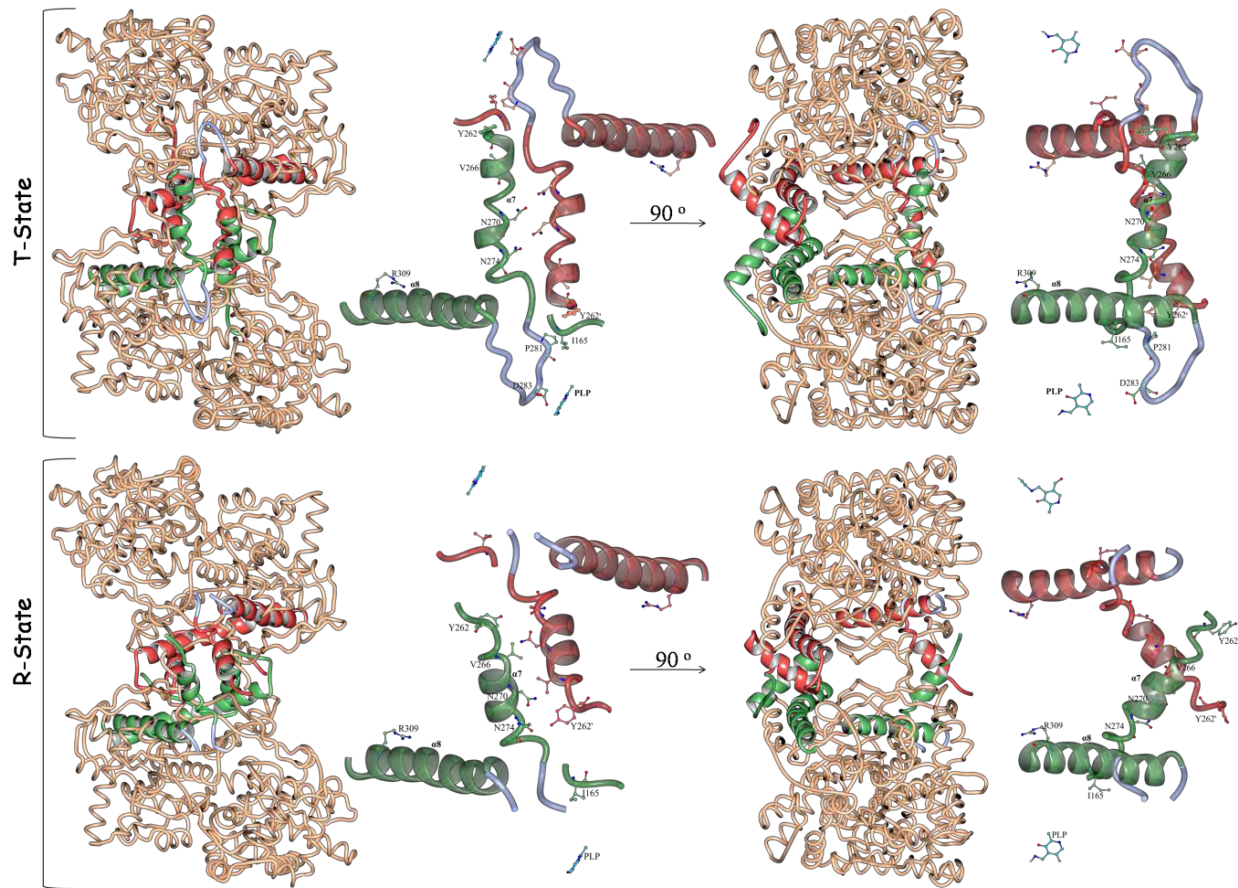
1.5.5 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της *συνέργειας* (*cooperativity*), κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μια περιοχή δεσμεύσεως επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δεσμεύσεως του ενζύμου για το δεσμευτή, κάτι το οποίο προϋποθέτει τη δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Η δραστηριότητα των ενζύμων μπορεί να ελεγχθεί από διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι (έχουν ελάχιστη ή καμία ομοιότητα με τα υποστρώματα) δεν έχουν κάποια άμεση αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα των αντιδράσεων που καταλύονται από τα αντίστοιχα ένζυμα. Η επίδραση αυτών των μεταβολιτών στη λειτουργία του ενζύμου φαίνεται να προκύπτει από μια αλλοστερική μετάπτωση (διαμορφωτική μεταβολή) η οποία επάγεται όταν δεσμευτεί στην πρωτεΐνη ο κατάλληλος παράγοντας. Πιθανότατα, η φωσφορυλάση *b* του γλυκογόνου αποτελεί το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο του οποίου ανακαλύφθηκε ο μηχανισμός με λεπτομέρεια. Η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή απουσία 5'-*AMP* και αρχικά είχε προταθεί ότι η *AMP* λειτουργεί ως συμπαράγοντας του ενζύμου. Τελικά φάνηκε πως η *AMP* δεν συμμετέχει στην αντίδραση αλλά ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση. Σύμφωνα με το πρότυπο *MWC* [67] ο αλλοστερικός τροποποιητής επηρεάζει την λειτουργία του ενζύμου μεταβάλλοντας και όχι καταστρέφοντας τη δομή του. Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε ομότροπες και ετερότροπες. Οι ομότροπες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται μεταξύ πανομοιότυπων προσδετών ενώ οι ετερότροπες μεταξύ διαφορετικών προσδε-

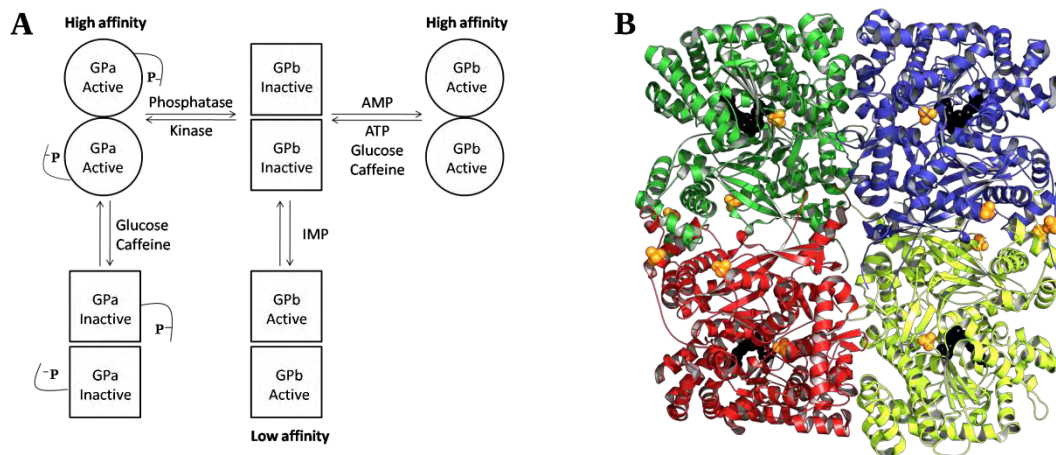
τών. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι олиγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις, δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την *T* μορφή (χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα) και τη *R* μορφή (υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα), οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά *L* η οποία είναι ίση με T/R . Υπό αυτή την έννοια διακρίνονται δύο ήδη αλλοστερισμού, ο αρνητικός αλλοστερισμός και ο θετικός αλλοστερισμός. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγενειά τους με συγκεκριμένους προσδέτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση ενός συγκεκριμένου προσδέτη στη θέση του μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομότροπων και ετερότροπων αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές (αλλοστερικές) αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της *R* διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [67-69].

1.5.5.1 Η αλλοστερική μετάπτωση στην *GP*

Η αλλοστερική μετάπτωση της *GP* παρουσιάζεται στην *Εικόνα 12*. Στην *T*-στερεοδιαμόρφωση της *GPb*, η πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο είναι περιορισμένη λόγω του βρόχου 280s (κατάλοιπα 182-287) και της *Asp283* η οποία κατευθύνεται εντός του καταλυτικού κέντρου μέσω της σύνδεσης που δημιουργεί με την 5' φωσφορική ομάδα της *PLP* με τη βοήθεια δύο μορίων ύδατος. Στην *T*-στερεοδιαμόρφωση ο βρόχος 280s πακετάρεται έναντι του βρόχου που σχηματίζεται από τα αμινοξέα 377-384, γνωστός και ως βρόχος 380s. Κατά τη μετάπτωση στην *R*-στερεοδιαμόρφωση εκτοπίζεται ο βρόχος 280s, κάτι το οποίο σχετίζεται με αλλαγή στη διαμόρφωση του βρόχου 380s. Στην *Εικόνα 12* παρουσιάζεται η αλλοστερική μετάπτωση της *GP* από το *T*- στην *R*-στερεοδιαμόρφωση στη συνολική τρισδιάστατη δομή αλλά και μεταξύ των πύργων του ενζύμου. Η *His571* διασπά το δεσμό υδρογόνου που σχημάτιζε με το *Asp283* και δημιουργεί μια νέα αλληλεπίδραση με την *Tyr623*, η *Arg569* αντικαθιστά την όξινη ομάδα της *Asp283* με αποτέλεσμα η είσοδος στο καταλυτικό κέντρο να είναι προσβάσιμη. Οι αλλαγές στην *Arg569*, καθώς διακόπτονται οι επαφές που έχει στην *T* διαμόρφωση, με τα κατάλοιπα *Ile165*, *Pro281*, και *Asn133*, σχετίζονται με τις αλλαγές στη διαμόρφωση αυτών των καταλοίπων έτσι ώστε οι αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο να συνδέονται με τα γεγονότα της αλληλεπίδρασης πύργου/πύργου, και μέσω των αλλαγών στην τεταρτοταγή διαμόρφωση να σχετίζονται με τα γεγονότα αλληλεπίδρασης στο κέντρο φωσφορυλίωσης και στο κέντρο αναγνώρισης *AMP*. Το κατάλοιπο *Glu382* εκτοπίζεται κατά 4.5 Å και διασπάται η γέφυρα άλατος που υπήρχε στην *T*-στερεοδιαμόρφωση μεταξύ του *Glu382* και της *Arg770*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετακινηθεί η περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου και η *C*-τελική περιοχή, κάτι το οποίο οδηγεί στην ελεύθερη πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο. Κατά τη μετάπτωση από την *T*-στερεοδιαμόρφωση στην *R*-, υπάρχουν μεγάλες διαφορές που σχετίζονται κυρίως με το κέντρο αναγνώρισης των ορθοφωσφορικών ιόντων [41, 57].



Εικόνα 12: Αλλοστερική μετάπτωση της *GPb* από τη *T*- στην *R*- στερεοδιαμόρφωση. Ο βρόχος 280s δεν μπορεί να αποτυπωθεί ξεκάθαρα στην *R*-στερεοδιαμόρφωση γιατί παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα ([49], PDB-ID: 4MRA; Leonidas D.D., et al., Unpublished results, PDB-ID:3E3N)



Εικόνα 13: **A)** Μία απλή προσέγγιση του τρόπου ενεργοποίησης της *GPb* μέσω αλλοστερισμού ή μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση της φωσφορυλίωσης. Με τετράγωνο συμβολίζεται η *T*-στερεοδιαμόρφωση ενώ με κύκλο η *R*-στερεοδιαμόρφωση (Σχεδιασμός της εικόνας σύμφωνα με τους [4, 43]). **B)** Η φωσφορυλίωση του γλυκογόνου στην *R*-στερεοδιαμόρφωση σχηματίζει τετραμερές σε σύμπλοκο με θειικά ιόντα (πορτοκαλί) και την *PLP* (μαύρο). Τα θειικά ιόντα ενεργοποιούν την *GPb*.

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση *a*, αλλά όχι η *b* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση *T* στην *R*. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης *a* από την κατάσταση *R* στην *T* απενεργοποιώντας το ένζυμο (βλ. *εδάφιο 1.5*). Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την *AMP* διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. Στην *Εικόνα 13* φαίνεται η ρύθμιση της φωσφορυλάσης [4].

1.5.6 Η GP ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων

Στους διαβητικούς ασθενείς η γλυκογονόλυση εξακολουθεί να αποτελεί μια σημαντική πηγή παραγωγής γλυκόζης παρότι τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένα. Έτσι, αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να έχουν ρόλο στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη [2]. Όπως ήδη αναφέραμε οι περισσότερες ενώσεις έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ανάλογα γλυκόζης με τον *53d* να αποτελεί τον πλέον βιοδραστικό αναστολέα για το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [59]. Εκτός από το καταλυτικό κέντρο στο στόχαστρο των ερευνών βρίσκονται και τα υπόλοιπα κέντρα του ενζύμου που αναλύθηκαν στο *εδάφιο 1.5.4.*, όπου αναφέρονται και παραδείγματα αναστολέων για κάθε κέντρο του ενζύμου. Σήμερα, εκμεταλλευόμενοι τις γνωστές δομές των ενζύμων και με τη βοήθεια των ηλεκτρονικών υπολογιστών μπορούμε να σχεδιάσουμε φάρμακα τα οποία θα αναμένουμε να έχουν σημαντική δράση έναντι συγκεκριμένων κέντρων των ενζύμων [6]. Εκτός από τις ενώσεις που προέρχονται από οργανική σύνθεση, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αναστολείς ενζύμων οι οποίοι προέρχονται από φυτά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί ώστε με μικρές αλλαγές στην δομή τους, μέσω οργανικής σύνθεσης, να οδηγήσουν σε πιο εκλεκτικά φάρμακα ενάντια συγκεκριμένων στόχων. Πρόσφατα ένα άρθρο ανασκόπησης των *Hayes* και συνεργατών έδωσε μια συνολική εικόνα των φυσικών ενώσεων που έχουν βρεθεί ότι μπορούν να αναστείλουν τη δράση της *GP* και ενδεχομένως να έχουν αντι-υπεργλυκαιμική δράση [62]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο πλέον φυσικός βιοδραστικός αναστολέας έναντι της *GP* είναι το ελλαγικό οξύ [50]. Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχουν δείξει ότι μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ποντικών *ob/ob* [70].

1.6 Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες-X

Η ακτινοβολία ακτίνων-X αποτελεί μέρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος που κυμαίνεται μεταξύ 0.01 έως 10 nm. Οι ακτίνες-X φαίνεται να πρωτοανακαλύφθηκαν από τον Γερμανό φυσικό *Wilhelm Röntgen* το 1895 (*Εικόνα 14*). Στη συνέχεια, το 1912, ο *Max von Laue* υπέθεσε ότι επειδή οι ακτίνες-X έχουν μήκος κύματος παρόμοιο με τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στα στερεά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διερεύνηση της δομής στερεών. Η υπόθεση αυτή αποδείχθηκε σωστή και ο *Max von Laue* βραβεύτηκε με το βραβείο νόμπελ φυσικής το 1914 [71]. Επομένως, ήταν λογικό ότι η χρήση των ακτίνων-X θα έβρισκε αρχικά εφαρμογή στην ιατρική, ως διαγνωστικό εργαλείο, με την μορφή της ακτινογρα-

φίας. Όντως, οι ακτίνες-X αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την διάγνωση πολλών ασθενειών και κυρίως διάφορων μορφών κακοήθων όγκων (καρκίνων)



Εικόνα 14: Αριστερά, η πρώτη ακτινογραφία του χεριού της συζύγου του Wilhelm Röntgen. Δεξιά, ο Wilhelm Röntgen.

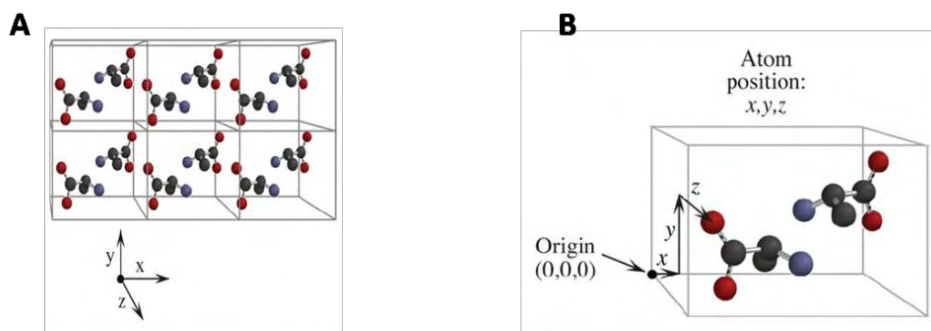
Στις μέρες μας, οι ακτίνες-X έχουν πληθώρα εφαρμογών, από τις κλασικές εφαρμογές στην ιατρική, τη μελέτη της αλληλεπίδραση πρωτεϊνών/πρωτεϊνών - πρωτεϊνών/προσδετών έως την ανακάλυψη “κρυφών” πορτρέτων σε γνωστούς πίνακες ζωγραφικής [72]. Η εφαρμογή των ακτίνων-X έχει ξεπεράσει τα όρια του πλανήτη μας, μιας και με τη χρήση ρομποτικής τεχνολογίας είναι δυνατή η εξερεύνηση της σύστασης του εδάφους του πλανήτη Άρη [73]. Οι παραπάνω εφαρμογές, αλλά και πολλές ακόμα, αναδεικνύουν την εξαιρετικής σημασίας συμβολή της ανακάλυψης των ακτίνων-X.

Η ακτινοβολία ακτίνων-X έχει βοηθήσει στις προσπάθειες που γίνονται την τελευταία δεκαετία ώστε να καταδειχθεί η δομική βιολογία ως το κέντρο της διαδικασίας εύρεσης νέων φαρμάκων. Η χρήση της κρυσταλλογραφίας ως μέθοδο για την οπτικοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ένωσης και πρωτεΐνης, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των μη ειδικών επιδράσεων καθοδηγώντας τις προσπάθειες που γίνονται στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας έναντι συγκεκριμένων και επιλεκτικών αλληλεπιδράσεων με το στόχο. Δυστυχώς, όμως, δεν είναι εφικτή η καθημερινή πρόσβαση σε πηγές ακτίνων-X *Synchrotron*, που αποτελεί την πιο αποτελεσματική οδό για απόκτηση δεδομένων υψηλής ποιότητας [74]. Επιπλέον, τροχοπέδη στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποτελεί η χρήση πρωτεϊνικών κρυσταλλών. Αυτό δυσκολεύει τις μελέτες, ειδικά όταν υπάρχουν μικρές ποσότητες από τον παράγοντα που θέλουμε να μελετήσουμε. Βέβαια, υπάρχουν και άλλες τεχνικές όπως η φασματοσκοπία μάζας και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου αλλά λειτουργούν μέσω μιας επαγωγικής διαδικασίας αποκλείοντας εναλλακτικές λύσεις, κάτι το οποίο διαφέρει ριζικά από τις εικόνες που παράγονται από την ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X [75].

Η χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X για τη διερεύνηση της δομής των μακρομορίων, με πλέον γνωστή την ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής του DNA [76], έχει ενδιαφέρουσα ιστορική αλληλουχία γεγονότων και η έρευνα γύρω από αυτό τον τομέα έχει οδηγήσει στην απονομή πολλών βραβείων νόμπελ, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο άρθρο ανασκόπησης των Jaskolski και συνεργατών [71].

1.6.1 Η φύση των κρυστάλλων

Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες πολλές μεγαλομοριακές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, σταθεροποιούνται για να σχηματίσουν κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Κατά την είσοδο από τη διαλυτή στην κρυσταλλική κατάσταση, μεμονωμένα μόρια της ουσίας υιοθετούν μια ή περισσότερες ίδιες κατευθύνσεις. Ο κρύσταλλος που προκύπτει είναι μια επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη συστοιχία μορίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Στην *Εικόνα 15A* απεικονίζεται μια τέτοια συστοιχία μορίων. Οι γραμμές στην εικόνα διαιρούν τον κρύσταλλο σε πανομοιότυπες μοναδιαίες κυψελίδες. Με τον όρο μοναδιαία (ή στοιχειώδη) κυψελίδα εννοούμε τη βασική και απλούστερη μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο. Η συστοιχία των σημείων στις γωνίες ή στις κορυφές των μοναδιαίων κυψελίδων ονομάζεται πλέγμα. Εάν γνωρίζουμε το ακριβές περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας μπορούμε να φανταστούμε ολόκληρο τον κρύσταλλο σαν μια πακεταρισμένη συστάδα πολλών μοναδιαίων κυψελίδων που στοιβάζονται η μία δίπλα και πάνω από την άλλη, περίπου, σαν πανομοιότυπα κουτιά σε μια αποθήκη [77, 78]. Η τοποθεσία ενός ατόμου δίνεται συνήθως από ένα σύνολο τρισδιάστατων καρτεσιανών συντεταγμένων x , y και z . Μία από τις κορυφές χρησιμοποιείται ως η αρχή του συστήματος των συντεταγμένων των στοιχειωδών κυψελίδων και της ανατίθενται οι συντεταγμένες $x = 0$, $y = 0$ και $z = 0$, που συνήθως αναγράφονται $(0,0,0)$ όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 15B* [77]. Στις απλούστερες περιπτώσεις που αφορούν πρωτεΐνες, η ασύμμετρη μονάδα είναι ένα μονομερές μόριο πρωτεΐνης. Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο, κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-X, έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας [77, 78].



Εικόνα 15: **A)** Έξι μοναδιαίες κυψελίδες σε κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιέχει δύο μόρια αλανίνης (τα άτομα του υδρογόνου δεν φαίνονται) σε διαφορετικές διαμορφώσεις. **B)** Η θέση ενός ατόμου στη μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να ταυτοποιηθεί από ένα σύνολο συντεταγμένων στο χώρο [77].

1.6.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

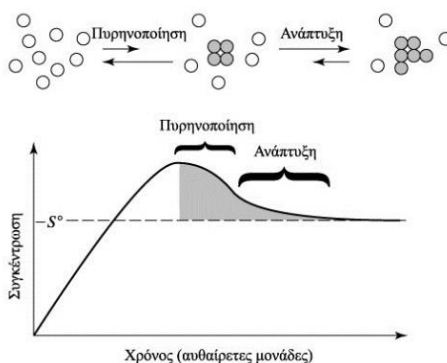
Οι κρυσταλλογράφοι αναπτύσσουν κρυστάλλους πρωτεϊνών με ελεγχόμενη βραδεία κατακρήμνιση από υδατικό διάλυμα κάτω από συνθήκες που δεν προκαλείται μετουσίωση της πρωτεΐνης. Υπάρχουν ουσίες που έχουν τη δυνατότητα να επιφέρουν κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Ιοντικές ενώσεις, όπως είναι τα άλατα, οδηγούν στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών μέσω μιας διαδι-

κασίας που ονομάζεται "εξαλάτωση". Οι οργανικοί διαλύτες προκαλούν επίσης κατακρήμνιση πρωτεϊνών, αλλά συχνά αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αφυδατώνουν. Το υδατοδιαλυτό πολυμερές *polyethylene glycol (PEG)* χρησιμοποιείται ευρέως επειδή αποτελεί ταυτόχρονα ισχυρό κατακρήμνιστικό και ασθενές μετουσιωτικό. Ένας απλός τρόπος για να επιτευχθεί βραδεία κατακρήμνιση είναι να γίνει προσθήκη ενός μετουσιωτή σε ένα υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης μέχρις ότου η συγκέντρωση του μετουσιωτή να είναι ακριβώς παρακάτω από εκείνη που απαιτείται για την καθίζηση της πρωτεΐνης. Τότε, το νερό αφήνεται να εξατμιστεί βραδέως, κάτι το οποίο αυξάνει ελαφρώς τη συγκέντρωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του μετουσιωτή έως ότου συμβεί η κατακρήμνιση. Η πιθανότητα η πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο ή αντιθέτως ένα περιττό άμορφο στερεό εξαρτάται από πολλές ιδιότητες του διαλύματος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, της θερμοκρασίας, του pH και της ιοντικής ισχύος. Η εύρεση των συγκεκριμένων συνθηκών για την παραγωγή κρυστάλλων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, απαιτεί συνήθως αρκετές δοκιμές [77]. Επίσης, το προς κρυστάλλωση δείγμα θα πρέπει να έχει περισσότερη από 95 % βιοχημική καθαρότητα για να παράγει έναν κρύσταλλο. Βιοχημικά καθαρό ονομάζεται ένα δείγμα όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Επιπλέον το δείγμα θα πρέπει να είναι και δομικά καθαρό και κατά συνέπεια τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου. Η δομική καθαρότητα αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο βήματα:

- ✓ Ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρηνοποίηση και
- ✓ Ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου.

Το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η πυρηνοποίηση, δηλαδή ο σχηματισμός εναρκτήριων μοριακών συμπλεγμάτων από τα οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι, αποτελεί το σημαντικότερο από τα δύο βήματα που αναφέρθηκαν. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, τότε ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Επομένως, πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο. Στην *Εικόνα 16* παρουσιάζεται η διαδικασία της κρυστάλλωσης [78]. Όταν μια ουσία είναι κρυσταλλική συνήθως είναι καθαρή γιατί κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης της τα συστατικά που δεν κρυσταλλώνονται

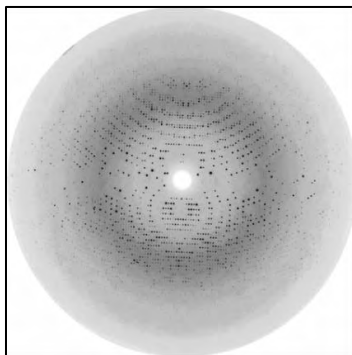
παραμένουν στο διάλυμα. Όταν κρύσταλλοι μεγάλης ποικιλίας έρχονται σε επαφή με το μητρικό τους υγρό για αρκετό χρόνο, τότε οι μεγάλοι κρύσταλλοι μεγαλώνουν ακόμα περισσότερο, εις βάρος των μικρών που εξαφανίζονται [79].



Εικόνα 16: Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός πυρήνων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρή πιθανότητα βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκεντρώσεις κοντά στην διαλυτότητα S° του μορίου [78].

1.6.3 Ακτίνες-X

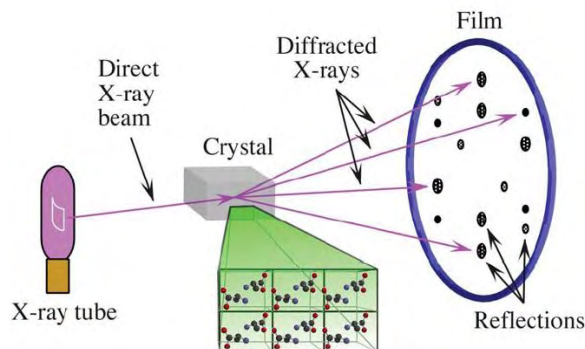
Η συνηθέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των χημικών και φαρμακευτικών κρυσταλλικών δομών, καθώς και των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μορίων είναι η περίθλαση των ακτίνων-X. Οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στα κρυσταλλικά σώματα είναι της ίδιας τάξης μεγέθους (από 0.1 μέχρι 25 Å) με τα μήκη κύματος των ακτίνων-X. Έτσι οι κρύσταλλοι δρουν σαν φράγματα περίθλασης για τις ακτίνες-X. Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής των δομών που προαναφέρθηκαν γίνεται από τα διαγράμματα περίθλασης, που λαμβάνονται από χιλιάδες προσανατολισμούς, σε σχέση με τη διεύθυνση της δέσμης των ακτίνων-X [79]. Στην *Εικόνα 17* φαίνεται ένα περιθλασίγραμμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε σύμπλοκο με αναστολέα.



Εικόνα 17: Περιθλασίγραμμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε σύμπλοκο με αναστολέα

Κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων ένας κρύσταλλος τοποθετείται μεταξύ μιας πηγής ακτίνων-X και ενός ανιχνευτή ακτίνων-X, όπως φαίνεται στην (*Εικόνα 18*). Ο κρύσταλλος διαπερνάται από μια στενή ακτίνα ακτίνων-X, η οποία προέρχεται από την πηγή. Η απλούστερη πηγή είναι ένας σωλήνας ακτίνων-X και ο απλούστερος ανιχνευτής είναι ένα φωτογραφικό φιλμ, στο οποίο θα εμφανιστούν σκούρες κηλίδες όπου προσπέσουν οι ακτίνες-X. Αυτά

τα σημεία ονομάζονται αντανάκλασεις επειδή προκύπτουν από τον κρύσταλλο σαν να αντανάκλωνται από την επιφάνεια των ατόμων [77].



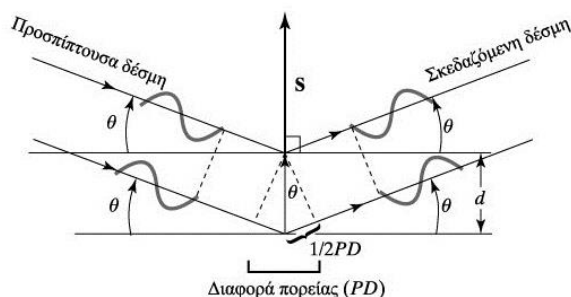
Εικόνα 18: Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Η ακτίνα-X περιθλάται από τον κρύσταλλο σε πολλές διακεκριμένες δέσμες (αντανάκλαση) πάνω στο φιλμ. Οι θέσεις και οι εντάσεις αυτών των αντανάκλασεων περιέχουν την πληροφορία που χρειάζεται για να καθοριστεί η μοριακή δομή [77].

1.6.4 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-X είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση μοριακού δεσμού. Η ενέργεια ενός κβάντου αυτής της ακτινοβολίας είναι περίπου 8000eV, που είναι περίπου η ενέργεια των ηλεκτρονίων στα ατομικά τροχιακά τους. Αυτή η ισοδυναμία της ενέργειας οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου να είναι πρώτιστα υπεύθυνα για τη σκέδαση των ακτίνων-X. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε έναν δεδομένο όγκο του χώρου (η πυκνότητα των ηλεκτρονίων) καθορίζει, πόσο έντονα ένα άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-X. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-X οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της περίθλασης. Στην περίθλαση των ακτίνων-X, αντιμετωπίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως κύμα. Οι γενικές θεωρίες και οι συνέπειες της περίθλασης ισχύουν για ακτινοβολίες οποιασδήποτε ενέργειας. Η περίθλαση του ορατού φωτός χρησιμοποιείται συχνά για να επεξηγηθούν οι αρχές που διέπουν την περίθλαση των ακτίνων-X από ένα κρύσταλλο [78]. Η σκέδαση αναφέρεται απλά στην ικανότητα των αντικειμένων να αλλάζουν την κατεύθυνση ενός κύματος. Στην περίπτωση του ορατού φωτός, το απλούστερο παράδειγμα είναι η ανάκλαση από ένα κάτοπτρο. Το κάτοπτρο αλλάζει απλώς την κατεύθυνση των φωτεινών κυμάτων. Μη ανακλώντα αντικείμενα μπορούν επίσης να σκεδάσουν τα φωτεινά κύματα. Ένα αντικείμενο που τοποθετείται στην πορεία μια φωτεινής δέσμης, προερχόμενης από μια σημειακή πηγή, δεν μπορεί να σχηματίσει σκιά με σαφή όρια, λόγω της σκέδασης από τις ακμές του. Η προέλευση της σκέδασης μπορεί να αναλυθεί καλύτερα με αφετηρία την αρχή του *Huygen*, η οποία δηλώνει ότι κάθε σημείο ενός μετώπου κύματος μπορεί να θεωρηθεί ως πηγή ενός νέου μετώπου κύματος. Η ταχύτητα αυτού του νέου μετώπου κύματος είναι ίση με αυτή του αρχικού. Για ένα ανεμπόδιστο μέτωπο κύματος, το δευτερογενές μέτωπο μπορεί να κατασκευαστεί σχεδιάζοντας κύκλους ακτίνας $r=vt$ (όπου v είναι η ταχύτητα του κύματος και t είναι ο χρόνος) σε σημεία επί του αρχικού μετώπου και μετά συνδέοντας τις εφαπτόμενες σε κάθε έναν από αυτούς τους κύκλους. Αντικείμενα που τοποθετούνται στην πορεία ενός μετώπου κύματος, ενεργούν ως σημεία διάδοσης για τα νέα μέτωπα. Το εντελώς νέο μέτωπο κύματος, που προκύπτει από αυτά, καλείται σκεδαζόμενο κύμα [78].

1.6.5 Ο Νόμος του Bragg

Το 1912, ο *W. L. Bragg* ανέπτυξε μια απλή σχέση για να εξηγήσει, το πώς η περίθλαση σχετίζεται με τις γενικές θέσεις των σημειακών αντικειμένων στον χώρο. Για την παραγωγή του νόμου του *Bragg* για την περίθλαση, αρχικά απλοποιήθηκε το εννοιολογικό μοντέλο της περίθλασης, θεωρώντας τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος ως παράλληλα επίπεδα. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις d , όπως φαίνεται στην *Εικόνα 19*. Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων-Χ (με μήκος κύματος λ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία θ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδάζει το κύμα υπό την ίδια γωνία [78].



Εικόνα 19: Ο νόμος του *Bragg* για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ συμβαίνει, όταν η διαφορά πορείας PD μεταξύ των ανακλώμενων δεσμών από διαδοχικά επίπεδα (σε απόσταση d μεταξύ τους) είναι ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Το διάνυσμα σκέδασης S είναι κάθετο στα ανακλώντα επίπεδα και το μέτρο του είναι ίσο με το αντίστροφο της απόστασης μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης [78].

Δεδομένου ότι η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του d , οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Έχοντας ένα μεγάλο αριθμό επιπέδων, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή μόνο όταν τα ανακλώμενα κύματα είναι ακριβώς εν φάσει (κορυφές κυμάτων που ευθυγραμμίζονται με κορυφές, κόμβοι με κόμβους, και κοιλάδες με κοιλάδες). Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται, μόνο όταν η διαφορά μεταξύ του μήκους διαδρομής του προσπίπτοντος και του ανακλώμενου κύματος, PD , είναι ίση με ακέραιο (n) πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ακτίνων-Χ [78].

$$PD = n\lambda \quad (1)$$

Αυτή η διαφορά στα μήκη των διαδρομών συσχετίζεται με την απόσταση που χωρίζει τα ανακλώντα επίπεδα με την απλή τριγωνομετρική σχέση,

$$\frac{1}{2} PD = d \sin \theta \quad (2)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2) στην (1), παράγεται ο νόμος του *Bragg* για την περίθλαση

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3) \quad \eta \quad \frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{n}{d} \quad (4)$$

Αυτή η απλή σχέση διατυπώνει δύο θεμελιώδεις προτάσεις σχετικά με τις ιδιότητες της περίθλασης. Καταρχήν, από την εξίσωση (3) αποδεικνύεται ότι οι γωνίες στις οποίες παρατηρείται η περίθλαση είναι κβαντισμένες για ακέραιες τιμές του n (0,1,2,...). Για έναν στοίχο άπειρων σκε-

δαστών, η μόνη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί μια ανάκλαση, είναι να ικανοποιείται ο νόμος του Bragg. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εκμηδενίζεται [78].

Δεύτερον, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της γωνίας *Bragg* (θ) και της ισαπόστασης μεταξύ των ανακλώντων επιπέδων (d). Αυτό σημαίνει ότι μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε ένα κρύσταλλο οδηγούν σε μικρότερες γωνίες περίθλασης. Εναλλακτικά, μπορεί να μετασχηματιστεί η αντίστροφη σχέση σε ευθεία αναλογία με τον καθορισμό ενός νέου μεγέθους, του *διανύσματος σκέδασης* (S). Το διάνυσμα σκέδασης έχει μέτρο $|S| = \frac{n}{d}$, και διεύθυνση κάθετη προς το ανακλών επίπεδο. Έτσι η εξίσωση (4) μπορεί να ξαναγραφεί ως:

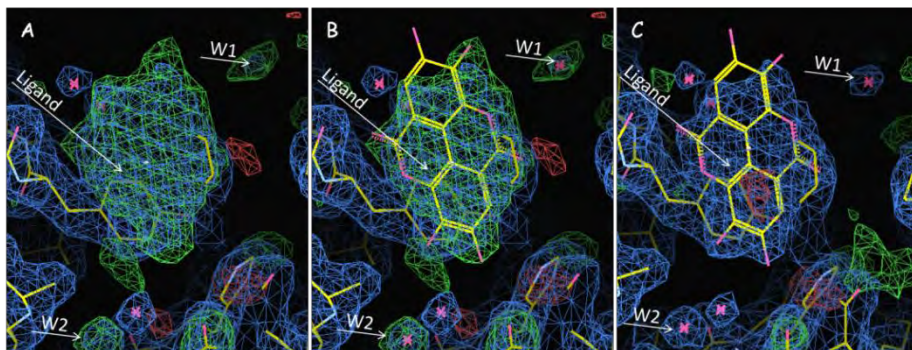
$$\frac{2\sin\theta}{\lambda} = \frac{n}{d} = |S| \quad (5)$$

Όπου, το S έχει μονάδες αντιστρόφου μήκους, και συνεπώς, επιτρέπει να εισαχθεί μια έννοια γνωστή ως «αντίστροφος χώρος». Το S εξετάζεται ως ένας τρόπος συσχέτισης της γεωμετρίας των ανακλώντων επιπέδων με την απόσταση που χωρίζει τις παρατηρούμενες ανακλάσεις [78]. Για την συνεισφορά τους στην ανάλυση κρυσταλλικών δομών με τη χρήση ακτίνων-X, οι *William Henry Bragg* και *William Lawrence Bragg* βραβεύτηκαν το 1915 με το βραβείο Νόμπελ Φυσικής. Ο *W.L. Bragg* είναι ο νεότερος στην ιστορία στον οποίο έχει απονεμηθεί βραβείο Νόμπελ, σε ηλικία 25 ετών [71].

1.6.6 Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας αποτελούν τα αρχικά αποτελέσματα από ένα πείραμα κρυσταλλογραφίας, όπου οι συντεταγμένες των ατόμων του μορίου που μελετήθηκε είναι μία μόνο ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο βασικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας μπορεί να υπολογιστεί αριθμητικά από το μετασχηματισμό του *Fourier* από το εύρος των παρατηρούμενων (πειραματικών) εντάσεων των ανακλάσεων F_{obs} και από τις φάσεις. Οι φάσεις, ϕ_{calc} , δεν παρέχονται από πειραματικά δεδομένα και υπολογίζονται από το συγκεκριμένο μοντέλο. Ένας τέτοιος χάρτης (F_{obs} , ϕ_{calc}) αναπαριστά μια προσέγγιση της πραγματικής δομής, που εξαρτάται από την ακρίβεια των φάσεων που έχουν υπολογιστεί, κάτι το οποίο εξαρτάται από το πόσο σωστό είναι το μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των φάσεων. Ένας άλλος τύπος χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας ονομάζεται διαφορικός χάρτης και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τις διαφορές μεταξύ των εντάσεων που υπολογίστηκαν και των εντάσεων που παρατηρήθηκαν πειραματικά και από τις υπολογιζόμενες φάσεις ($F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc}). Ο χάρτης αυτός δείχνει τις διαφορές μεταξύ των πειραματικών και των συγκεκριμένων δομών-μοντέλων. Σε ένα τέτοιο χάρτη τα σημεία που υπάρχουν στη δομή που προέρχεται από πειραματικά δεδομένα αλλά δεν υπάρχουν στο μοντέλο παρουσιάζονται σε περιγράμματα χαρτών θετικής πυκνότητας, ενώ περιοχές που υπάρχουν στο μοντέλο αλλά λείπουν από τη δομή που προέρχεται από πειραματικά δεδομένα παρουσιάζονται σε περιγράμματα χαρτών αρνητικής πυκνότητας (*Εικόνα 20*). Στην πράξη είναι σύνηθες να χρησιμοποιείται ο χάρτης ($2F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc}), που αντιστοιχεί σε μια υπέρθεση των δυο προηγούμενων τύπων ηλεκτρονιακών χαρτών, ώστε να παρατηρήσουμε την ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς και τις βελτιώσεις που είναι απαραίτητες να κάνουμε στο εν-

σωματωμένο μοντέλο ώστε να ταιριάζει καλύτερα στην ηλεκτρονική πυκνότητα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 20*.



Εικόνα 20: Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (Η.Π.) $2F_{obs}-F_{calc}$, κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης του μοντέλου. Με πράσινο απεικονίζεται η θετική πυκνότητα (Μπλε-πράσινο: περιοχές που υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα αλλά όχι στη δομή-μοντέλο) ενώ με κόκκινο η αρνητική (Μπλε-κόκκινο: περιοχές που δεν υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα αλλά υπάρχουν στη δομή-μοντέλο) Α) Χάρτης Η.Π., μετά την ενσωμάτωση του μοντέλου. Β) Βελτιστοποίηση του μοντέλου: Προσθήκη προσδέτη και μορίων ύδατος στις περιοχές με θετική πυκνότητα (*Bl* εδάφιο 1.6.7). Γ) Χάρτης Η.Π., μετά το *REFMAC*. Παρατηρούμε ότι τα μόρια ύδατος και ο προσδέτης ταιριάζουν στη νέα ηλεκτρονική πυκνότητα.

Επειδή όλα τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας περιέχουν σε κάποιο βαθμό σφάλματα, είναι αναμενόμενο ότι οι χάρτες που θα προκύψουν θα έχουν σε κάποιο βαθμό θόρυβο. Συνήθως, ένα καλό περίγραμμα απεικόνισης για χάρτη ($2F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc}), είναι το $\sim 1\sigma$ ενώ για τον χάρτη ($F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc}) είναι το $\sim 3\sigma$, όπου σ είναι το *rmsd* (*Root-mean-square deviation of atomic positions*). Υψηλότερα επίπεδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ορισμένες περιπτώσεις για να αναδειχτούν ορισμένα χαρακτηριστικά, όμως η χρήση χαμηλότερων επιπέδων μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερη έμφαση του θορύβου παρά των πραγματικών χαρακτηριστικών [80].

1.6.7 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλαχθεί, εκτός και εάν πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νέων κρυστάλλων και συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις, μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονική πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Το μοντέλο θα μπορούσε να προσαρμοστεί οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Υπάρχει όμως ένα πρόβλημα με τους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας από παράγοντες δομής που προέρχονται από τις παρατηρηθείσες εντάσεις. Μόνο το $|F(S)_{obs}|$ μπορεί να προσδιοριστεί από τα δεδομένα έντασης. Οι πληροφορίες φάσεων μπορούν να υπολογιστούν μόνο από το μοντέλο, $F(S)_{calc}$. Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο επηρεάζει έντονα τους χάρτες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως [78].

Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R (ή παράγοντας R):

$$R = \frac{\sum ||F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}||}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

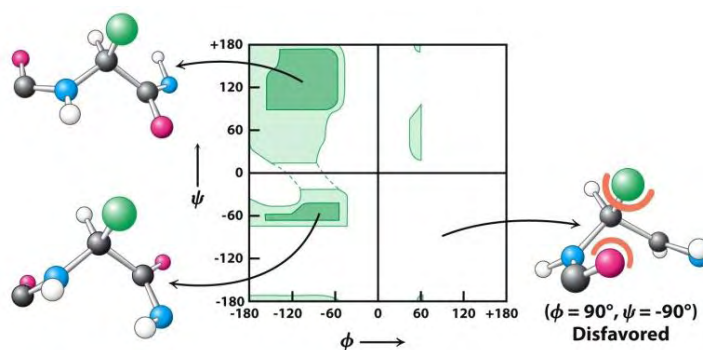
Σε αυτήν την περίπτωση, συγκρίνονται μόνο τα μέτρα των μετρηθέντων και υπολογισθέντων παραγόντων δομής. Γενικά, οι δείκτες αξιοπιστίας R κυμαίνονται μεταξύ του 70% (0.7) για ένα τυχαίο «ταίριασμα» και μίας τιμής που πλησιάζει το 0% για ένα ιδανικό τέλειο ταίριασμα. Ένα ιδανικό ταίριασμα δεν είναι επιτεύξιμο, πρώτιστα λόγω των εγγενών περιορισμών στην ποιότητα των δεδομένων και των ατελειών στον κρύσταλλο. Ένας γενικός κανόνας για τα μακρομόρια είναι, ότι ένα μοντέλο μπορεί να προταθεί ως μια λύση στη δομή, όταν η βελτιστοποίηση φθάσει ως έναν παράγοντα R 20% (0,2) ή χαμηλότερο. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο σχηματισμού μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων, πρέπει να ορισθεί με ακρίβεια η δομή του μακρομορίου μαζί με ένα μεγάλο ποσοστό του διαλύτη. Δυστυχώς, ένας χαμηλός παράγοντας R μπορεί να επιτευχθεί τεχνικά και για ένα ανακριβές μοντέλο, προσθέτοντας απλώς περισσότερο διαλύτη για να καλυφθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε διάφορα μέρη της μοναδιαίας κυψελίδας. Έτσι, η επίλυση της δομής ενός μακρομορίου από τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων-Χ εξαρτάται πολύ από την κατασκευή αλλά και από την ποιότητα των μοριακών μοντέλων. Στη διαδικασία αυτή, υπάρχει ένας αριθμός βημάτων, που εξαρτάται από υποκειμενική προτίμηση. Ευτυχώς, είναι διαθέσιμα διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκυπτόντων μοντέλων.

Οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρίς αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η εξής: Αρχικά διαχωρίζεται ένα μέρος (περίπου 5% έως 10%) από τα συνολικά πειραματικά δεδομένα για να χρησιμοποιηθεί ως σετ δεδομένων ελέγχου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μόνο ως προς τα υπόλοιπα δεδομένα (σετ δεδομένων εργασίας). Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ο παράγοντας R υπολογίζεται τόσο για το σετ δεδομένων εργασίας όσο και για το σετ ελέγχου. Ο δεύτερος παράγοντας R καλείται R_{free} , αναγνωρίζοντας ότι θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από την επίδραση του μοντέλου. Εάν κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης το μοντέλο βελτιώνεται πραγματικά (αντικειμενικά), τότε ο R_{free} θα πρέπει να συνεχίσει να μειώνεται. Από κάποιο σημείο, ωστόσο, ο R_{free} θα πάψει να μειώνεται και ακόμα και αν η περαιτέρω βελτιστοποίηση ή οι προσθήκες στο μοντέλο μειώσουν τον παράγοντα R των δεδομένων εργασίας, το μοντέλο θεωρείται ότι έφθασε πλέον το επίπεδο ποιότητας που του επιτρέπουν τα δεδομένα. Με περαιτέρω προσθήκες στο μοντέλο, ο R_{free} μπορεί όντως να αρχίσει να αυξάνεται, ακόμη και όταν ο R για το σετ δεδομένων εργασίας αρχίζει να μειώνεται. Αυτό μαρτυρά, ότι τα δεδομένα είναι πλέον υπερπροσαρμοσμένα (περισσότερες μεταβλητές από ότι τα δεδομένα επιτρέπουν) [78].

1.6.8 Έλεγχος του δομικού μοντέλου-Διάγραμμα *Ramachandran*

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Επίσης τα μόρια που συμμετέχουν θα πρέπει να έχουν κάποια γεωμετρικά και στερεοχημικά χαρακτηριστικά (γωνίες, μήκη δεσμών, πεπτιδικό δεσμοί, κτλ) τα οποία δεν πρέπει να αποκλίνουν από τα επιτρεπτά όρια. Ο *N. G. Ramachandran*, διαπίστωσε ότι πολλοί συνδυασμοί ϕ και ψ γωνιών δεν είναι δυνατοί λόγω των στερικών συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι τιμές που επιτρέπονται μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα δισδιάστατο σχήμα που ονομάζεται διάγραμμα *Ramachandran*. Τα τρία τέ-

ταρτα των πιθανών συνδυασμών των γωνιών ϕ και ψ είναι αδύνατο να πραγματοποιηθούν διότι δημιουργούνται τοπικές στερικές συγκρούσεις. Ο στερικός αποκλεισμός, δηλαδή το γεγονός ότι δύο άτομα δεν μπορούν να είναι στο ίδιο σημείο συγχρόνως, μπορεί να είναι σημαντικότερος κανόνας οργάνωσης της δομής πρωτεϊνών [4]. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα (Εικόνα 21) 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 στερεοχημεία.

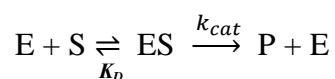


Εικόνα 21: Ένα διάγραμμα *Ramachandran* που δείχνει τις γωνίες ϕ και ψ . Οι τιμές ϕ και ψ είναι περιορισμένες λόγω των συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι επιτρεπτές τιμές ϕ και ψ φαίνονται με σκούρο πράσινο, ενώ οι οριακές τιμές φαίνονται με ανοιχτό πράσινο. Η δομή που φαίνεται δεξιά είναι εκείνη που δημιουργεί τις λιγότερες συγκρούσεις μεταξύ των ατόμων [4].

1.7 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Πριν από περίπου 100 χρόνια οι *Michaelis* και *Menten* δημοσίευσαν την, σήμερα πλέον, κλασσική δημοσίευση, μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, χρησιμοποιώντας της ιμπερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους [81].

Για μία ενζυμική αντίδραση του τύπου:



Όπου:

K_D: σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ES (1/mol ή 1/M)

k_{cat}: σταθερά ταχύτητας καταλύσεως

E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

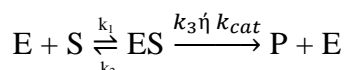
ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Οι *Michaelis* και *Menten* κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{K_D + [S]} \quad (6)$$

Στην πραγματικότητα όμως η εξίσωση που έχει βαπτιστεί ως *Michaelis-Menten* δεν είναι η παραπάνω, και προέρχεται από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσης *Briggs* και *Haldane*, σύμφωνα με την οποία μετά την ανάμιξη των αντιδρώντων η ταχύτητα διασπάσεως του *ES* αυξάνει γρήγορα και πολύ σύντομα φθάνει την ταχύτητα σχηματισμού του, δημιουργώντας *σταθεροποιημένη κατάσταση (steady-state)* για την αντίδραση:



Όπου k_1 , k_2 , k_3 , οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων

Στη σταθεροποιημένη κατάσταση το σύμπλοκο *ES* διατηρεί σχεδόν σταθερή τη συγκέντρωση του, ενώ για το ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρείται σημαντική μεταβολή των απόλυτων τιμών των συγκεντρώσεων $[S]$ και $[P]$, γεγονός που συνεπάγεται ότι $d[ES]/dt = 0$.

Ως σταθερά *Michaelis-Menten* (K_M) ορίζεται ο λόγος $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* που αποτελεί θεμέλιο της κινητικής των ενζύμων και προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσεως είναι η παρακάτω:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Όπου $[E_0]$ η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου [69]

1.7.1 Αλλοστερισμός στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της συνέργειας, κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μια περιοχή δέσμευσης επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δέσμευσης του ενζύμου για το δεσμευτή, κάτι το οποίο προϋποθέτει την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα σε ένα τυπικό ένζυμο βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο, ακόμα και μικρές μεταβολές στη στερεοδιάταξη των πλευρικών ομάδων των αμινοξικών κατάλοιπων σε μία υπομονάδα, είναι δυνατόν να μεταφερθούν, μέσω της τριτοταγούς δομής, και να επιφέρουν στεροδιατακτικές μεταβολές σε κάποια άλλη μακρινή περιοχή του ενζυμικού μορίου. Σύμφωνα με το πρότυπο *MWC* [67], στο οποίο υπακούει και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b*, κάθε μονομερές διαθέτει μία εξειδικευμένη θέση δεσμεύσεως για κάθε δεσμευτή. Η ύπαρξη σιγμοειδούς καμπύλης οφείλεται στην υπόθεση ισορροπίας μεταξύ της *T*- και *R*- διαμόρφωσης. Η *T*-στερεοδομή αποτελεί δομικό απόθεμα για παραγωγή *R*-στερεοδομής. Σύμφωνα με το πρότυπο οι αλλοστερικοί ενεργοποιητές δεσμεύονται στην *R*-στερεοδομή, τη σταθεροποιούν και μειώνουν την τιμή του λόγου $[T]/[R]$. Αντίθετα οι

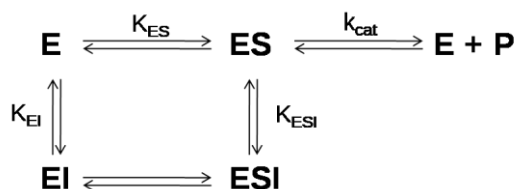
αλλοστερικοί αναστολείς δεσμεύονται στην T -στερεοδομή, τη σταθεροποιούν και αυξάνουν την τιμή του λόγου $[T]/[R]$. Σε κάθε περίπτωση η δέσμευση του τροποποιητή (ενεργοποιητή/αναστολέα) επηρεάζει την ισορροπία $T \rightleftharpoons R$ και οδηγεί σε εμφάνιση σιγμοειδούς συμπεριφοράς [69].

1.7.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Στη συναγωνιστική αναστολή η V_{max} παραμένει ανεπηρέαστη, αλλά η φαινομενική K_M αυξάνεται. Ο αναστολέας συγκρατεί μέρος του ενζύμου στην κατάσταση EI όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 22*. Όταν η συγκέντρωση του S αυξάνεται σημαντικά, τότε η ανασταλτική επίδραση στην ταχύτητα μπορεί να ξεπεραστεί και ως εκ τούτου προκύπτει ο όρος “συναγωνιστικός”. Στη μη συναγωνιστική αναστολή η πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο δεν επηρεάζει την πρόσδεση του αναστολέα. Στην περίπτωση αυτή η K_M παραμένει σταθερή ενώ η V_{max} μειώνεται. Σε αυτή τη περίπτωση αύξηση στη συγκέντρωση του υποστρώματος δεν μπορεί να οδηγήσει σε άρση της ανασταλτικής επίδρασης στην ταχύτητα. Σε αντιδιαστολή με την συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή, στην ανταγωνιστική αναστολή έχουμε επίδραση του αναστολέα τόσο στην K_M όσο και στη V_{max} του ενζύμου. Συνήθως η ανταγωνιστική αναστολή συναντάται σε ένζυμα που καταλύουν πολυ-υποστρωματικές αντιδράσεις [82]. Ο όρος συναγωνιστική αναστολή χρησιμοποιείται για να περιγράψει δύο πιθανές καταστάσεις:

α) Ο αναστολέας και το υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο υπόστρωμα, έτσι η δέσμευση του ενός στο ένζυμο να αποκλείει την δέσμευση του άλλου

β) Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει όταν ο αναστολέας δεσμεύεται κοντά στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, όχι ακριβώς σε αυτή, σε τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται στερεοχημικά η προσέγγιση και δέσμευση του υποστρώματος [69].



Εικόνα 22: Γενικό διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα K_{ES} , K_{EI} , K_{ESI} , αποτελούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ότι είναι ανενεργό [82]

Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στην κινητική των *Michaelis* και *Menten*, όπως απουσία αναστολέα, με τη διαφορά ότι για την σταθερά K_M και τη μέγιστη ταχύτητα V_{max} διαμορφώνονται νέες τιμές, οι οποίες ονομάζονται φαινομενικές (*apparent values*) [69] και παρακάτω θα συμβολίζονται ως $K_{M(app)}$ και $V_{max(app)}$. Η φαινομενικές τιμές προσδιορίζονται ώστε τελικά να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i (*inhibitory constant*).

Η σταθερά *Michaelis-Menten* μπορεί να θεωρηθεί ως η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρεί με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι, όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της K_M , τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υπο-

στρώματος απαιτείται για να πετύχουμε τη μισή από τη μέγιστη ταχύτητα, ή με άλλα λόγια τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα του υποστρώματος να αντιδράσει με το ένζυμο [83]. Η σταθερά *Michaelis-Menten* υπολογίζεται συνήθως με τη μέθοδο των *Lineweaver-Burk*, που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου. Απαραίτητη είναι η προσεκτική επιλογή των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων $[S]$, ώστε οι αντίστοιχες αντίστροφες τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στον άξονα των τετμημένων [84].

Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* που προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης, όπως αναφέραμε, είναι:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Αν η παραπάνω σχέση γραφτεί με τη μορφή διπλού αντιστρόφου και ληφθεί υπ' όψιν ότι $V_{max} = k_3[E_0]$, τότε λαμβάνεται η σχέση:

$$\frac{1}{v_{max}} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (8)$$

Η σχέση (8) περιγράφει την ευθεία η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των *Lineweaver-Burk*, και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές $1/v$ στον άξονα των τεταγμένων και $1/[S]$ στον άξονα των τετμημένων. Η κλίση της ευθείας ισούται με K_M/v_{max} , το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με $1/v_{max}$ και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με $-1/K_M$. Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η K_M [69].

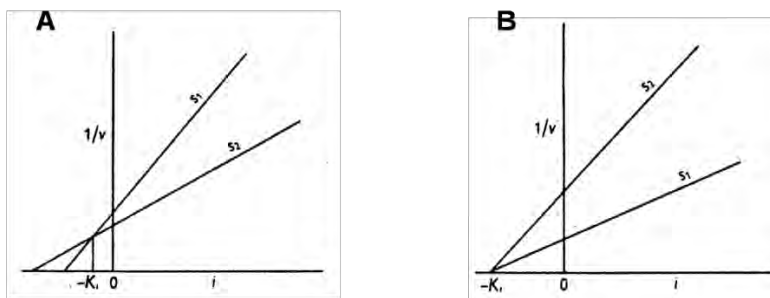
Διαγράμματα Dixon (1952):

Η σταθερά αναστολής K_i , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, υπολογίζεται συνήθως με βασιζόμενοι στις εξίσωση των *Michaelis-Menten* για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (A)$$

Όπου $[i]$ η συγκέντρωση του αναστολέα

Για τον υπολογισμό της K_i υπάρχει μια απλή μέθοδος μέσω γραφικών παραστάσεων που πρωτοδιατυπώθηκε από τον Dixon M. το 1953 [85]. Εάν απεικονίσουμε διάγραμμα $1/v$ προς $[i]$, διατηρώντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή, θα παρατηρήσουμε ότι δημιουργείται μια ευθεία γραμμή. Εάν σε ένα διάγραμμα με τον ίδιο τρόπο απεικονίσουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι γραμμές θα τέμνονται σε ένα σημείο αριστερά του κάθετου άξονα όπως φαίνεται στα διαγράμματα της Εικόνα 23, με το σημείο τομής στον άξονα των τετμημένων να προσδιορίζει την τιμή $-K_i$.



Εικόνα 23: **A)** Προσδιορισμός της K_i σε συναγωνιστική αναστολή, **B)** Προσδιορισμός τη K_i σε μη-συναγωνιστική αναστολή [85].

Η απόδειξη είναι η παρακάτω. Κάθε γραμμή σύμφωνα με την εξίσωση *A* παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{v} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{[I]}{K_i} \quad (B)$$

Στο σημείο της διασταύρωσης το $1/v$ και το $[I]$ όπως επίσης και η V_{max} θα είναι ίδια και για τις δύο γραμμές, όταν πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Ως εκ τούτου:

$$\frac{K_M}{[S_1]} + 1 + \frac{K_M}{[S_1]} \cdot \frac{[I]}{K_i} = \frac{K_M}{[S_2]} + 1 + \frac{K_M}{[S_2]} \cdot \frac{[I]}{K_i}, \quad \text{ή} \quad \frac{1}{[S_1]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) = \frac{1}{[S_2]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (Γ)$$

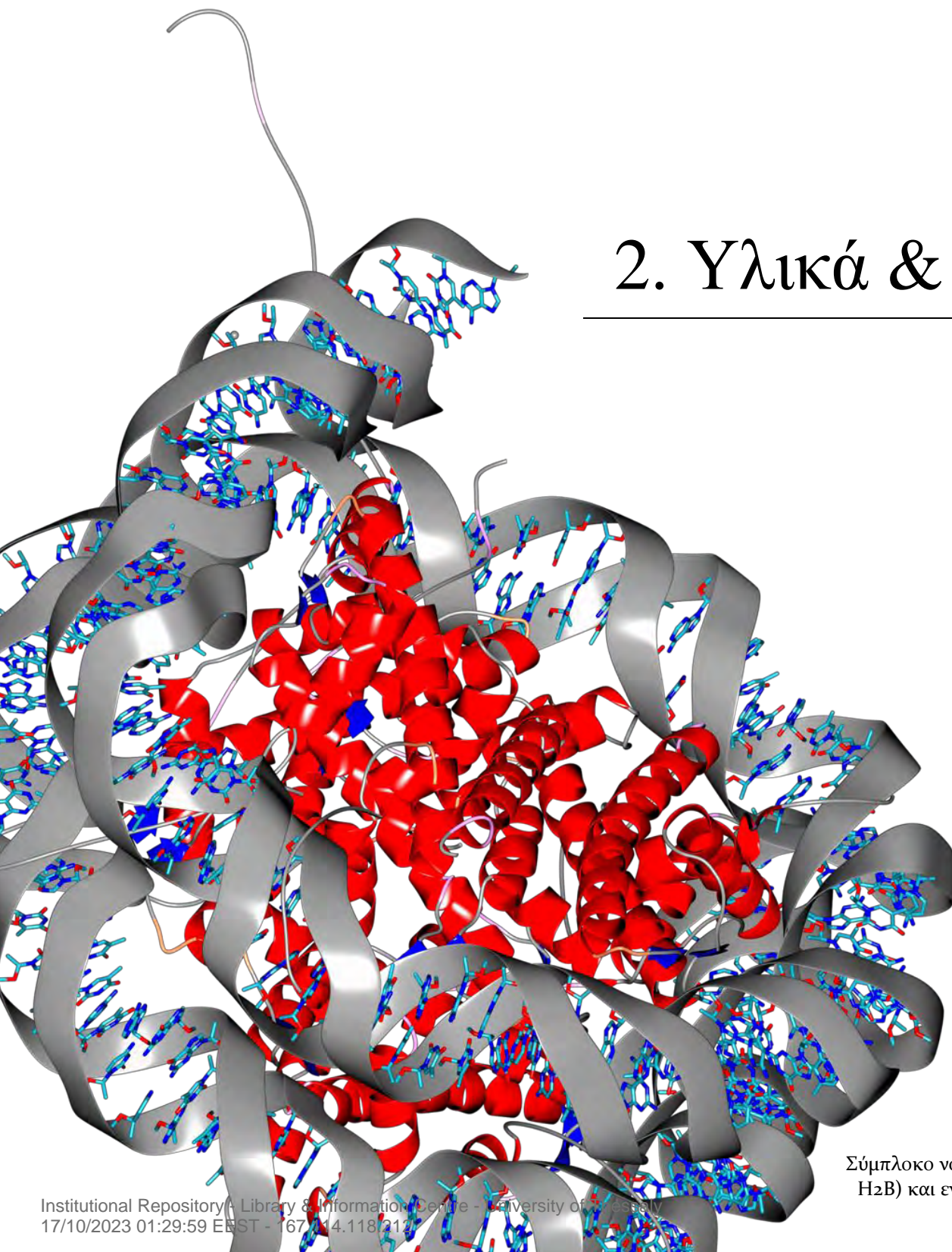
Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν $[S_1] = [S_2]$ ή $[I] = -K_i$

Επίσης μπορούμε να υπολογίσουμε και την K_M από το ίδιο διάγραμμα όταν έχει βρεθεί η K_i . Αυτό συμβαίνει διότι κάθε γραμμή κόβει τη βασική γραμμή στην τιμή $[I]$ που είναι ίση με $-K_i([S]/K_M + 1)$.

Στην περίπτωση της μη-συναγωνιστικής αναστολής, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της *Εικόνα 23B*, οι γραμμές δεν διασταυρώνονται, αλλά συναντώνται σε ένα σημείο που δίνει ξανά την τιμή $-K_i$. Αυτό φαίνεται εύκολα όταν βάλουμε $1/v = 0$ στην μη-συναγωνιστική εξίσωση:

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

[85]



2. Υλικά & Μέθοδοι

Σύμπλοκο νουκλεοσώματος (H₃, H₄, H₂A, H₂B) και ενός τμήματος DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων. PDB-ID: 1AOI

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
Ampicillin	Serva
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂)	Merck
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Appllichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Appllichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Appllichem
Magnesium Chloride anhydrous (MgCl ₂)	Alfa Aesar
Manganese (II) Chloride (MnCl ₂)	Sigma
Methanol	Scharleu
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Scharleu
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH	Merck
PMSF	AppliChem
Potassium chloride (KCl)	Merck
Pyridoxine	Sigma
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Tryptone	Serva
Yeast extract	Serva

Zinc acetate	Sigma
α -D-glucose-1-Phosphate	Sigma
β -GP	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
Na_2HPO_4	Merck
NaH_2PO_4	Merck

2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (mini gel)	BioRad
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπίκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπίκνωσης vivaspin 10000 cut0off	Sartorius Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple

2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Κύτταρα	Εταιρεία
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies
E. coli B834 Plyss	
Πλασμίδια	Εταιρεία
hlGP \rightarrow pDEST-14	Invitrogen
rmPhK- γ -trnc \rightarrow pGEX-6p-1	GE HealthCare

2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

Στήλες συγγένειας	Εταιρεία
His-Trap (Ni^{2+} Sepharose) υψηλής απόδοσης (HP)	GE Healthcare
Protino GST 4B Agarose	Macherey-Nagel
HiTrap Blue sepharose υψηλής απόδοσης (Cibacron Blue F3GA)	GE Healthcare
Στήλες Ιοανταλλαγής	Εταιρεία
Resource Q	GE Healthcare

2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η δυνατότητα εισαγωγής συγκεκριμένων πλασμιδιακών μορίων *DNA* σε κύτταρα γίνεται με τη μέθοδο που ονομάζεται μετασχηματισμός. Υπάρχουν τέσσερα συστήματα μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων τα οποία είναι η ηλεκτροδιάτρηση, η βαλλιστική μέθοδος, ο μετασχηματισμός με υπερήχους και ο χημικός μετασχηματισμός.

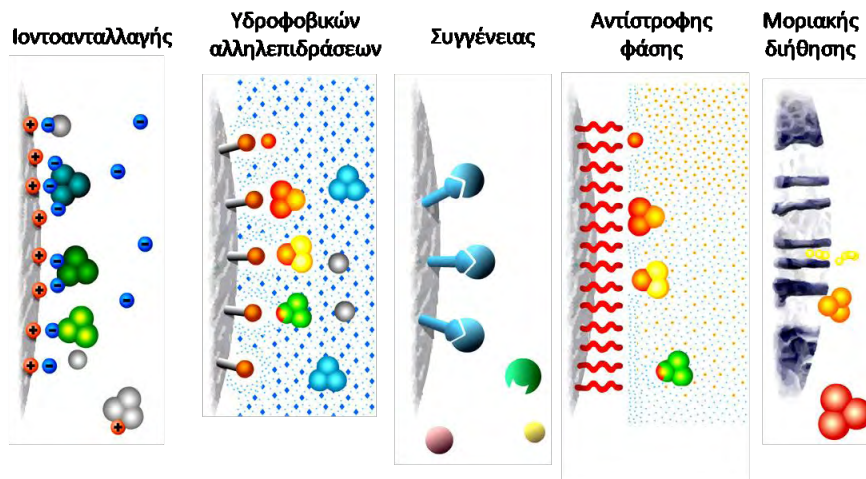
Χημικός μετασχηματισμός:

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι χημικού μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων, με το $CaCl_2$ και το *PEG* (πολυαιθυλική γλυκόλη) να αποτελούν τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Στον χημικό μετασχηματισμό με $CaCl_2$ τα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα με $CaCl_2$, επωάζονται με το πλασμίδιο σε θερμοκρασία $0\text{ }^{\circ}C$ και στη συνέχεια για μικρή διάρκεια σε θερμοκρασία $42\text{ }^{\circ}C$ (θερμικό σοκ). Το θερμικό αυτό σοκ προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης των δεκτικών κυττάρων που έχουν επεξεργαστεί με $CaCl_2$, ώστε το πλασμίδιο να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Στη συνέχεια η μεταφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}C$ εξασφαλίζει ότι η κυτταρική μεμβράνη θα επανέλθει στην αρχική της κατάσταση με αποτέλεσμα το πλασμιδιακό *DNA* που εισήχθη να παραμείνει στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου [86].

2.6 Υγρή χρωματογραφία-Σύστημα *FPLC*

Ο όρος χρωματογραφία, που προέρχεται από τις λέξεις «χρώμα» και «γράφειν», αναπτύχθηκε αρχικά από τον *Mikhail Tswett* το 1903, ο οποίος πέτυχε ένα χρωματικό διαχωρισμό φυτικών χρωστικών με τη χρήση στήλης. Από τότε μέχρι σήμερα οι βασικές αρχές της χρωματογραφίας παραμένουν ίδιες αν και η τεχνική αυτή εξελίχθηκε σε ένα εργαλείο ανεκτίμητης αξίας για τον διαχωρισμό μιγμάτων στα συστατικά τους αλλά και για την ταυτοποίηση των συστατικών που τα αποτελούν. Το 1952, οι *Martin A.J.P.*, και *Synger R.L.M.*, βραβεύτηκαν με το βραβείο *Nobel* για την εφεύρεση της χρωματογραφίας κατανομής [87, 88]. Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί υψηλή πίεση, συνήθως με οργανικούς διαλύτες και στήλες με μικρή διάμετρο, περίπου $5\text{--}40\text{ }\mu m$, για την επεξεργασία δειγμάτων με μικρό όγκο.

Το 1982, η εταιρεία *Pharmacia LKB* προχώρησε στην κατασκευή ενός συστήματος με μεγαλύτερη βιο-συμβατότητα, καθώς επέτρεπε τον υψηλής ανάλυσης διαχωρισμό βιοπολυμερών, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών. Το σύστημα της *AKTA FPLC (Pharmacia Biotech)* αποτελεί το πλέον σύγχρονο και αυτοματοποιημένο εργαλείο για τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Το σύστημα *FPLC* (ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών) έχει χαμηλότερο κόστος από το αντίστοιχο *HPLC*, με κάθε δοκιμή να είναι περίπου τριάντα φορές φθηνότερη. Το σύστημα *FPLC*, παρέχει σήμερα ένα μεγάλο εύρος χρωματογραφικών μεθόδων, όπως χρωματογραφία ιοντοαλλαγής, συγγένειας, μοριακής διήθησης, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και αντίστροφης φάσης, οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά στην *Εικόνα 24*. Οι στήλες αυτές μπορούν να ανταπεξέλθουν σε μεγάλους όγκους δειγμάτων και σε ένα μεγάλο εύρος υδατικών διαλυμάτων [89].



Εικόνα 24: Τα κυριότερα είδη της ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών

2.6.1 Χρωματογραφία συγγένειας

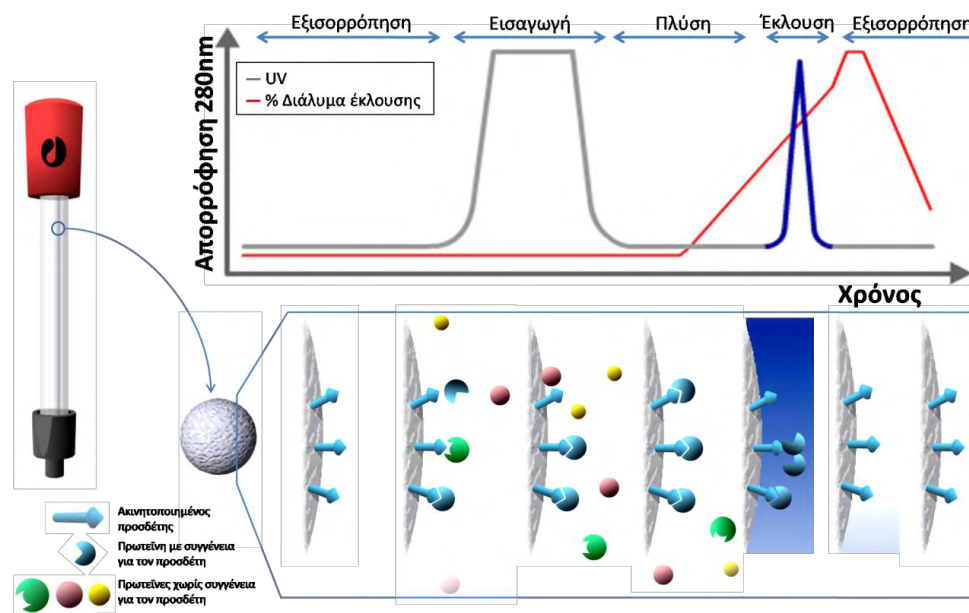
Η χρωματογραφία συγγένειας αξιοποιεί τα φαινόμενα βιο-αναγνώρισης υψηλής εξειδίκευσης και είναι ιδανική για τον καθαρισμό βιομορίων. Στο συγκεκριμένο τύπο χρωματογραφίας, το αδιάλυτο υλικό της μήτρας της στήλης διαθέτει ειδικές ικανότητες προσρόφησης που οφείλονται σε ομοιοπολική σύνδεση προσδέτη, ο οποίος έχει συγγένεια ως προς το βιομόριο στόχο και συνδέεται με αυτό. Όταν ένα δείγμα, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη στόχο, περάσει μέσα από μια στήλη που έχει έναν ακινητοποιημένο προσδέτη, τότε όλοι οι παράγοντες που εμφανίζουν κάποια συγγένεια, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος, θα παραμείνουν στη στήλη, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες που δεν έχουν συγγένεια θα περάσουν από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν (*flow through*). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη στόχος που έχει συνδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη, θα αποσυνδεθεί από αυτόν μέσω κάποιας αλλαγής στις πειραματικές συνθήκες, όπως αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος, της σύστασης του διαλύματος και της θερμοκρασίας ή προσθέτοντας κάποιον ανταγωνιστικό προσδέτη για το υλικό της στήλης [90]. Σε όλη τη διαδικασία του καθαρισμού, υπάρχει φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο μετράει την απορρόφηση του διαλύματος που εξέρχεται από τη στήλη και το αποτέλεσμα καταγράφεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να αναλυθεί σε βήματα όπως περιγράφεται στην Εικόνα 25:

- Εξισορρόπηση:** Το υλικό της στήλης εξισορροπείται με το διάλυμα όπου θέλουμε να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης (διάλυμα πρόσδεσης). Παρατηρούμε λοιπόν ότι κατά την εξισορρόπηση δεν υπάρχει συνδεδεμένο κάτι στο υλικό της στήλης, εκτός από τον ακινητοποιημένο προσδέτη, με αποτέλεσμα η απορρόφηση του εξερχόμενου διαλύματος από τη στήλη να είναι σταθερή. Στο στάδιο αυτό η απορρόφηση που εμφανίζεται στο UV οφείλεται στα συστατικά του διαλύματος πρόσδεσης.
- Εισαγωγή δείγματος:** Το δείγμα (συνήθως κυτταρόλυμα) εισέρχεται στη στήλη, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την ειδική, αλλά αντιστρεπτή, σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στο υλικό της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια, λόγω της πρόσδεσης ενός ακινητοποιημένου προσδέτη. Τα επιπλέον συστατικά του κυτταροπλάσματος που δεν συνδέονται απομα-

κρύνονται από τη στήλη με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του *UV* (*Flow through*).

- c) Πλύση: Όταν εισαχθεί όλο το δείγμα, τότε γίνεται πλύσιμο της στήλης με το διάλυμα πλύσης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες και να μείνει μόνο η πρωτεΐνη/ες που εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον ακινητοποιημένο προσδέτη. Αυτό οδηγεί σε μείωση και σταθεροποίηση της απορρόφησης του *UV*, επειδή οι πρωτεΐνες που εξέρχονται από τη στήλη μειώνονται μέχρι να σταματήσουν να απομακρύνονται άλλες. Η πλύση της στήλης γίνεται συνήθως με 10 όγκους στήλης από το διάλυμα πλύσης.
- d) Έκλυση: Αφού λοιπόν η απορρόφηση μείνει σταθερή για κάποιους όγκους στήλης, τότε εφαρμόζουμε το διάλυμα έκλυσης. Η έκλυση μπορεί να γίνει είτε με εφαρμογή 100 % του διαλύματος έκλυσης, είτε με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του (διαβάθμιση συγκέντρωσης), κάτι το οποίο οδηγεί σε απομάκρυνση της πρωτεΐνης που έχει μείνει συνδεδεμένη στο υλικό της στήλης. Το αποτέλεσμα είναι η συλλογή της πρωτεΐνης στόχου η οποία είναι πλέον σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.
- e) Το υλικό της στήλης επανα-εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης για επόμενη χρήση.

[91]



Εικόνα 25: Απλή απεικόνιση της διαδικασίας καθαρισμού μίγματος πρωτεϊνών με υγρή χρωματογραφία συγγένειας. Η έκλυση γίνεται με διαβάθμιση συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης (τιμήματα εικόνων από ισότοπο της GE Healthcare).

2.6.1.1 Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+}

Μία μεγάλη κατηγορία στη χρωματογραφία συγγένειας, αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων πάνω σε σφαιρίδια αгарόζης ή σεφαρόζης (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, *IMAC*). Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στη συγγένεια που διαθέτουν τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης, όπως ο χαλκός (Cu^{2+}), ο ψευδάργυρος (Zn^{2+}), το νικέλιο (Ni^{2+}) και το κοβάλτιο (Co^{2+}), με τις ιστιδίνες (*His*) και τις κυστεΐνες (*Cys*) σε ένα υδατικό περιβάλλον. Η χρωματογραφία *IMAC* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, από τη

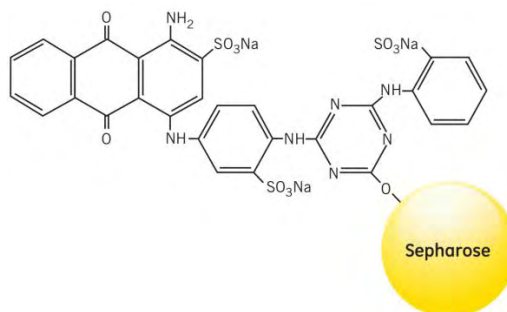
στιγμή της εφεύρεσης της, για τον καθαρισμό πληθώρας πρωτεϊνών και αποτελεί την πιο συχνή τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας. Η επιλογή του συγκεκριμένου ακινητοποιημένου μετάλλου εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε κάθε φορά να καθαρίσουμε. Συνήθως τα τρισθενή ή τετρασθενή κατιόντα όπως Al^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} , Zr^{4+} , προτιμούνται για τον καθαρισμό φωσφοπρωτεϊνών ή φωσφοπεπτιδίων, ενώ τα δισθενή κατιόντα χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που διαθέτουν ετικέτα ιστιδινών (*His-Tag*) [92]. Από όλα τα δισθενή μέταλλα, τα Ni^{2+} είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Συνήθως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες διαθέτουν τουλάχιστον 6 ιστιδίνες, η οποίες βρίσκονται είτε στο N-τελικό είτε στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και προσφέρουν μια υψηλή συγγένεια ως προς τα Ni^{2+} . Η έκλυση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση προσδετών που έχουν επίσης συγγένεια για το ακινητοποιημένο μέταλλο. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι το ιμιδαζόλιο το οποίο είναι όμοιο με τον δακτύλιο της ιστιδίνης [93].

2.6.1.2 Στήλη πρόσδεσης GST

Εκτός από την ετικέτα ιστιδινών, ένας πολύ διαδεδομένος τρόπος καθαρισμού πρωτεϊνών, είναι η προσθήκη ετικέτας της S-τρασφεράσης της γλουταθειόνης (*GST-Tag*, 26 KDa). Η έκφραση της πρωτεΐνης γίνεται σε ένα φορέα *pGEX* ο οποίος προσδίδει την επικράτεια της *GST* στο N-τελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η έκφραση πρωτεϊνών με ετικέτα *GST* χρησιμοποιείται διότι οδηγεί σε υψηλή έκφραση και καθαρισμό της πρωτεΐνης από ένα βακτηριακό κυτταρόλυμα. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό, είναι ότι η ετικέτα *GST* λειτουργεί ως πρωτεΐνη συνοδός (*chaperone*) και βοηθάει ώστε η πρωτεΐνη να είναι σωστά αναδιπλωμένη και να εκφράζεται στην περισσότερη διαλυτή μορφή, παρά στα έγκλειστα σωμάτια (*inclusion bodies*). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεσμεύεται στη γλουταθειόνη που βρίσκεται ακινητοποιημένη στη ρητίνη της στήλης και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια απομακρύνονται με πλύση της στήλης. Τέλος, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλύεται με χρήση ανηγμένης γλουταθειόνης [94].

2.6.1.3 Χρωστική Cibacron Blue F3G-A

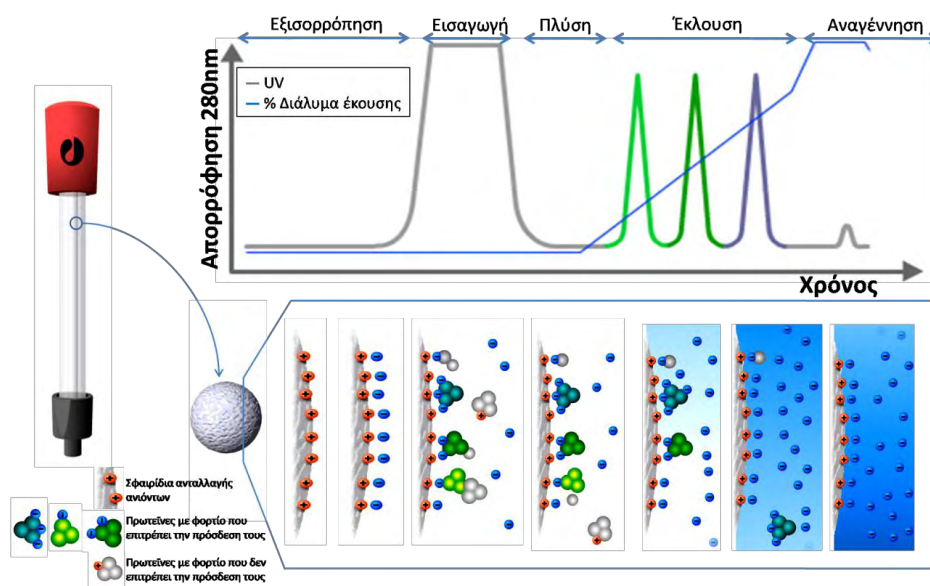
Η συνθετική πολυκυκλική χρωστική, *Cibacron Blue F3G-A*, καθηλωμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης, χρησιμοποιείται στην υγρή χρωματογραφία συγγένειας και εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι πολλών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανόμενων των κινασών. Η εκλεκτικότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η χρωστική εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τον συμπαράγοντα NAD^+ , όπως φαίνεται στην *Εικόνα 26*. Οι αφυδρογονάσεις που εξαρτώνται από NAD^+ και οι *ATP*-εξαρτώμενες κινάσες μπορούν να προσδένονται σε αυτή τη χρωστική. Εκτός όμως από αυτές τις πρωτεΐνες η *Cibacron Blue F3G-A* μπορεί και συγκρατεί πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, λιποπρωτεΐνες και ιντερφερόνες, οι οποίες προσδένονται λιγότερο ειδικά μέσω ηλεκτροστατικών και/ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων με το αρωματικό ανιόν του προσδέτη. Η έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος έκλυσης [91, 95].



Εικόνα 26: Η χημική δομή της χρωστικής Cibacron Blue F3G-A προσδεσμένη σε σφαιρίδιο σεφαρόζης

2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από *N*-τελικό και *C*-τελικό άκρο, καρβοξυλικές ομάδες από τις ασπάρτυλο και γλουτάμινο πλευρικές αλυσίδες, αμινομάδες από την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης, γουανιδική ομάδα από την πλευρική αλυσίδα της αργινίνης και μια ομάδα ιμιδαζολίου από την πλευρική αλυσίδα της ιστιδίνης. Αυτές οι ομάδες βρίσκονται στην επιφάνεια των σφαιρικών πρωτεϊνών. Η υγρή χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (*Ion Exchange Chromatography, IEC*) εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το *pH* επηρεάζει με μοναδικό τρόπο το καθαρό φορτίο της επιφάνειας κάθε πρωτεΐνης. Σε ένα τυπικό πείραμα χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και των αντίθετα φορτισμένων σφαιριδίων του υλικού της ρητίνης. Στο ισοηλεκτρικό σημείο (*pI*), το καθαρό φορτίο είναι μηδέν και επομένως η πρωτεΐνη δεν μπορεί να προσδεθεί στη στήλη. Σε *pH* πάνω από το *pI* αυξάνεται το καθαρό αρνητικό φορτίο και η πρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε υλικό που είναι θετικά φορτισμένο (ανιοανταλλάκτες) ενώ σε *pH* κάτω από το *pI* αυξάνεται το καθαρό θετικό φορτίο με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να προσδένεται σε αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια (κατιονανταλλάκτες) [96, 97].



Εικόνα 27: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Παρατηρούμε ότι οι λιγότερο ισχυρά προσδεσμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται πρώτες στα κλάσματα της έκλουσης (τμήματα εικόνων από ισότοπο της GE Healthcare).

Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής μπορεί να περιγραφεί με τα εξής βήματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 27:

- i. Εξισορρόπηση: Αρχικά, γίνεται εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες. Όταν επιτευχθεί η εξισορρόπηση, τότε όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης είναι συνδεδεμένες αντιστρεπτά με ιόντα αντίθετου φορτίου, όπως χλωρίου (Cl^-) ή νατρίου (Na^+). Το pH και η ιοντική ισχύς του αρχικού διαλύματος επιλέγεται έτσι ώστε όταν γίνει η εισαγωγή του δείγματος να συνδεθούν στη στήλη μόνο οι πρωτεΐνες/η που μας ενδιαφέρουν και να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν οι ανεπιθύμητες.
- ii. Εισαγωγή του δείγματος και πλύση: Το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη που θα εισάγουμε θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το διάλυμα που έχει εξισορροπηθεί η στήλη ώστε να προσδεθούν όλες οι κατάλληλα φορτισμένες πρωτεΐνες-στόχοι, και να απομακρυνθούν, με πλύση της στήλης, όλες οι προσμίξεις που δεν προσδένονται στη στήλη. Η πλύση της στήλης γίνεται συνήθως με το διάλυμα εξισορρόπησης.
- iii. Έκλυση: Αφού γίνει η εισαγωγή του δείγματος και η πλύση της στήλης, τότε ακολουθεί η έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών συνήθως με αύξηση της ιοντικής ισχύος (αύξηση στη συγκέντρωση άλατος) ή με αλλαγή του pH του διαλύματος έκλυσης. Με την σταδιακή αύξηση της ιοντικής ισχύος (διαβάθμιση συγκέντρωσης) τα ιόντα των αλάτων (συνήθως Na^+ ή Cl^-) ανταγωνίζονται τους προσδεδεμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και σιγά σιγά οι προσδεδεμένοι παράγοντες αρχίζουν να αποσυνδέονται και να εκλύονται από τη στήλη, καθώς η ιοντική ισχύς συνεχίζει να αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες με χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο συγκεκριμένο pH , αρχίζουν να εκλύονται πρώτες ενώ οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο καθαρό φορτίο είναι αυτές που συνδέονται πιο ισχυρά με τα φορτία της στήλης με αποτέλεσμα να εκλύονται τελευταίες. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης, οι πρωτεΐνες εκλύονται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.
- iv. Αναγέννηση: Η πλύση της στήλης με ένα διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος οδηγεί σε αναγέννηση της στήλης καθώς απομακρύνεται ότι έχει μείνει ισχυρά προσδεδεμένο στη στήλη. Αυτό οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τέλος, η στήλη επανα-εξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ξανά.

[97]

2.6.2.1 Στήλη *Resource Q*

Το υλικό της στήλης της *Resource Q* (GE HealthCare) είναι θετικά φορτισμένο και ανήκει στην κατηγορία των ισχυρών ανιοανταλλακτών. Το εύρος pH που επιτρέπει η χρήση της συγκεκριμένης στήλης είναι 2-12 και το όριο δέσμευσης 45 mg (BSA) [97].

2.7 Αφαίρεση της ετικέτας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Αν και οι διάφορες ετικέτες συγγένειας αποτελούν εξαιρετικό βοήθημα για τον καθαρισμό πρωτεϊνών, έχουν σχεδιαστεί πολλές μέθοδοι για την απομάκρυνση τους από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένες ενδοπρωτεάσες που αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Οι ενδοπρωτεάσες αυτές μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν με χρωματογραφία συγγένειας, εφόσον διαθέτουν οι ίδιες κάποια ετικέτα συγγένειας. Από τις πιο γνωστές πρωτεάσες είναι η θρομβίνη, η *TEV* και η *3C* [98].

2.7.1 Πρωτεάσες *TEV* και *3C*

Η πρωτεάση *TEV* έχει μοριακό βάρος 49 *KDa* και η καταλυτική της ιδιότητα οφείλεται στο *C*-τελικό της τμήμα το οποίο έχει μοριακό βάρος 27 *KDa*. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση *TEV* είναι *Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln↓Ser/Gly*, όπου *Xaa* δηλώνει την παρουσία οποιουδήποτε αμινοξέος. Η *TEV* πρωτεάση έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την απομάκρυνση ετικετών συγγένειας με ιστιδίνες, διότι η καταλυτική *C*-τελική περιοχή της έχει εισαχθεί σε φορέα έκφρασης που προσδίδει ετικέτα ιστιδινών. Ωστόσο, σήμερα η πρωτεάση *TEV* υπάρχει και με ετικέτα *GST* αλλά και με τις δύο ετικέτες. Η πρωτεάση *3C* προέρχεται από τον ρινοϊό 14 και βρίσκεται διαθέσιμη σε εμπορική μορφή με ετικέτα *GST*, που ονομάζεται *PreScission Protease*, αλλά και με διπλή ετικέτα *GST-His₆*. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η *PreScission 3C* πρωτεάση είναι η *LEVLFQ↓GP* [99].

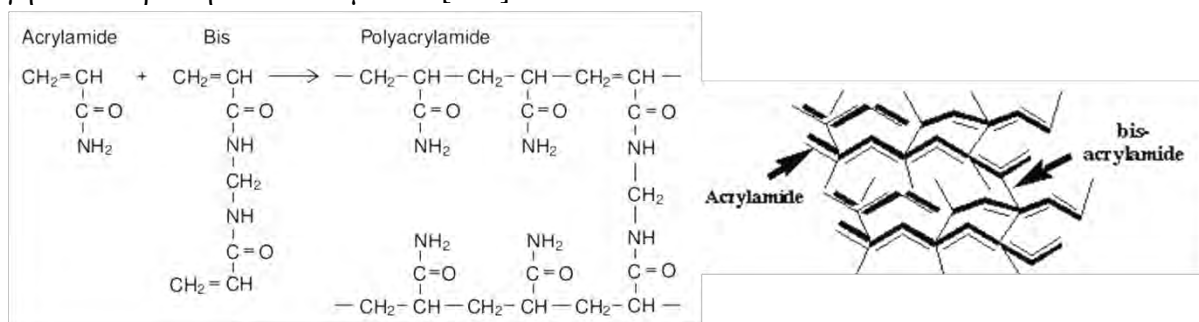
2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-Πηκτώματα

Στις περισσότερες εργαστηριακές μελέτες που σχετίζονται με τη μελέτη και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή τεχνική που μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος, το φορτίο, τον ολιγομερισμό και την καθαρότητα μια πρωτεΐνης καθώς επίσης και την ποσοτική ανάλυση των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες *daltons* στο μοριακό τους βάρος και κατά 0.1 μονάδα του *pH* στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει πολλές τεχνικές με την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) να αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η μέθοδος *SDS-PAGE* εφαρμόζεται συχνά στα κλάσματα που προέρχονται από τη χρωματογραφία πρωτεϊνών ώστε να γίνει μια οπτική παρατήρηση των προσμίξεων που υπάρχουν στο κάθε κλάσμα αλλά και για την αξιολόγηση της καθαρότητας της πρωτεΐνης που εισήχθη στη στήλη, μιας και κάθε συστατικό θα διατρήξει το πήκτωμα και θα διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό του βάρος. Κάποιες από τις υπόλοιπες μεθόδους ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (*2D*), ισοηλεκτρικής εστίασης και σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα, μιας και αυτό είναι που καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδα αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αгарόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500

kDa. Η πολυακρυλαμίδη έχει κάποια χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, όπως:

- Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
- Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη.
- Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς.
- Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται.
- Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδένουν χρωστικές των πρωτεϊνών.

Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το *N,N'*-methylbisacrylamide (*bis*) και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μια μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με μόριο *bis* ακρυλαμιδίου όπως φαίνεται στην *Εικόνα 28*. Έτσι, σχηματίζεται ένα στερεό πήκτωμα, του οποίου οι ίνες που έχουν δημιουργηθεί συγκρατούν τον διαλύτη στο εσωτερικό του πηκτώματος ο οποίος είναι απαραίτητος για την διατήρηση του τρισδιάστατου σχήματος του πηκτώματος. Η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για την έναρξη του πολυμερισμού και δημιουργούνται από την παρουσία *ammonium persulfate* και *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (*TEMED*). Το *TEMED* επιταχύνει την μετατροπή το *APS* σε ελεύθερες ρίζες θείου οι οποίες είναι αυτές που ξεκινούν τον πολυμερισμό με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκαλικό *pH*. Ο ρυθμός του πολυμερισμού όμως εξαρτάται από την θερμοκρασία, την καθαρότητα των αντιδραστηρίων και την συγκέντρωση των μονομερών (ακρυλαμίδιο και *bis* ακρυλαμίδιο) που συμμετέχουν στην αντίδραση πολυμερισμού. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τον πολυμερισμό είναι το οξυγόνο το οποίο είναι προτιμότερο να απομακρύνεται από τα διαλύματα με απαέρωση. Ωστόσο, καλής ποιότητας πηκτώματα παράγονται και χωρίς να έχει προηγηθεί απαέρωση των διαλυμάτων [100].



Εικόνα 28: Η αντίδραση πολυμερισμού. Παρατηρούμε πως σχηματίζεται δύο γραμμικά πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή ακρυλαμιδίου και συνδέονται μεταξύ τους με *bis* ακρυλαμίδιο.

Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην

κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*running buffer*: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1× (10 % glycerol, 154 mM Tris, 2 % SDS, 0.01 % bromophenol blue, 1.25 % β-Mercaptoethanol). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min στους 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από αυτά φορτώνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120 V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον Πίνακα 1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, λόγω της ροής του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης διαμέσου του πηκτώματος. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τες αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάση του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Η γλυκίνη, που υπάρχει στο *running buffer*, είναι ασθενές οξύ και μπορεί να απαντηθεί σε δυο καταστάσεις, ένα αφόρτιστο αμφιτεριόν ή ένα φορτισμένο γλυκινικό ανιόν. Σε χαμηλή τιμή pH, πρωτονιώνεται και άρα είναι αφόρτιστη. Σε υψηλότερες τιμές pH φορτίζεται αρνητικά. Κατά τη διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος, τα ιόντα της γλυκίνης απομακρύνονται από την κάθοδο και μεταναστεύουν προς την άνοδο. Στην άνοδο βρίσκεται η πηκτή επιστοιβαξης και τα δείγματα που έχουν χαμηλή τιμή pH (pH 6.8) οπότε η γλυκίνη χάνει το φορτίο της και δεν μεταναστεύει με μεγάλη ταχύτητα. Παράλληλα, στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχονται ιόντα χλωρίου τα οποία μετακινούνται, επίσης, από την κάθοδο με υψηλή κινητικότητα. Αυτό το γεγονός δημιουργεί μια στενή ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας στην κορυφή της πηκτής επιστοιβαξης όπου συγκεντρώνεται όλη η τάση του ρεύματος. Η πολύ υψηλή τάση του πεδίου οδηγεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (από το SDS) να μεταναστεύσουν προς την κάθοδο.

Πίνακας 1: Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμίδιου διαφορετικής πυκνότητας

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10 %	12 %
Συστατικά	Επιστοιβαξης (3 mL)	Διαχωρισμού (5 mL)	
dH ₂ O	2.1	1.9	1.6
30% Acrylamide-mix	0.5	1.7	2.0
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1.3	1.3
Tris 1.0 M, pH 8.8	0.38	-	-
SDS (10%)	0.03	0.05	0.05
APS 10%	0.03	0.05	0.05
TEMED	0.003	0.002	0.002

Οι πρωτεΐνες λόγω του υψηλού λόγου φορτίο/μάζα που διαθέτουν σε σχέση με τη γλυκίνη κινούνται ταχύτερα από τη γλυκίνη, αλλά βραδύτερα από τα ιόντα χλωρίου. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται μακροσκοπικά με τη συμπύκνωση του μετώπου ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε μια πολύ στενή ζώνη που μεταναστεύει προς την πηκτή διαχωρισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στην πηκτή να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού όπου η μετανάστευση είναι συνάρτηση του μοριακού μεγέθους καθώς αυξάνεται και η τριβή μεταξύ πρωτεϊνών και των πόρων του πλέγματος της πηκτής διαχωρισμού. Μόλις οι πρωτεΐνες εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού η τιμή του pH είναι αρκετά υψηλότερη όπου η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά και ως εκ τούτου έχει μεγαλύτερη κινητικότητα προς την άνοδο, ενώ οι πρωτεΐνες επιβραδύνονται διότι η πηκτή δρα ως ηθμός. Το αποτέλεσμα είναι πως οι πρωτεΐνες δε βρίσκονται πλέον σε μια στενή ζώνη υψηλής αντίστασης και υψηλού ηλεκτρικού πεδίου και έτσι αφήνονται να διαχωριστούν στο ενιαίο ηλεκτρικό πεδίο όπου μεταναστεύουν μέχρι να μην επιτρέπει το μέγεθός τους να διαπεράσουν τους πόρους του πλέγματος της πηκτής (*BioRad*). Καθώς οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή.

2.8.1 Χρώση πηκτώματος

Το πήκτωμα που λάβαμε μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε σε 10x διάλυμα οξικού οξέως μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Στη συνέχεια αποχύθηκε το διάλυμα οξικού οξέως και προστέθηκε το διάλυμα χρώσης το οποίο περιείχε 0.1 % *Coomassie Blue R250*, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και ύστερα έμεινε υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Έπειτα αποχύθηκε το διάλυμα χρώσης και προστέθηκε εκ νέου διάλυμα οξικού οξέος 10x. Ακλούθησε ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλήφθηκε για 3 φορές. Τέλος το πήκτωμα έμεινε με διάλυμα οξικού οξέος 10x μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση με *Coomassie Blue*.

2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος *Bradford*

Η μέθοδος *Bradford* (*Bradford 1976*) χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος *Bradford* είναι μια χρωματική μέθοδος που βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής *Commassie*, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης *BSA* γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μ L από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προστέθηκαν 780 μ L απιονισμένο ύδωρ και 200 μ L αντιδραστηρίου *Bradford 5x*, έτσι ώ-

στε να γίνει 1x. Τα διαλύματα (όγκου 1 mL) αναδεύτηκαν και αφέθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 10 min. Έπειτα έγινε ανάδευση των διαλυμάτων και ακολούθησε η φασματοφωτομέτρησή τους σε μήκος κύματος 595 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με βάση την πρότυπη καμπύλη.

2.10 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*)

Η απομόνωση της *rmGPb* (*rabbit muscle Glycogen Phosphorylase b*) έγινε από σκελετικούς μύες κονίκλων βασιζόμενοι στη μέθοδο των *Ficher* και *Krebs* χρησιμοποιώντας β-μερκαπτοαιθανόλη έναντι L-κυστεΐνης [101].

Βήμα 1^ο: Παραλαβή του μυϊκού ιστού, κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου

Από τρεις αρσενικούς κονίκλους αφαιρέθηκαν οι σκελετικοί μύες, οι οποίοι ομογενοποιήθηκαν μηχανικά και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις εκχυλίσσεις, εν ψυχρώ, με απιονισμένο ύδωρ. Οι δύο πρώτες εκχυλίσσεις πραγματοποιήθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος με το βάρος του ομογενοποιημένου ενώ η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους του ομογενοποιημένου. Η διήθηση του εκχυλίσματος κάθε φορά έγινε μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν επιτρέπεται να ξεπερνάει τα 30 min. Το εκχύλισμα που συλλέχθηκε διηθήθηκε (φιλτραρίστηκε) μέσω υαλοβάμβακα ώστε να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες και τα αιωρούμενα σωματίδια.

Βήμα 2^ο: Οξίνη καταβύθιση για την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος που παραλήφθηκε από το βήμα 1 ρυθμίστηκε στο 5.1-5.2 με την προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1 N υπό ελαφρά ανάδευση. Έπειτα το εκχύλισμα αφέθηκε για 5 min σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο η θολρότητα του διαλύματος αυξήθηκε λόγω κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση, σε 4225 g, για 30 min σε θερμοκρασία 0-4 °C. Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω αντλίας κενού *Buchner*, εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Έπειτα ακολούθησε ρύθμιση του pH του διηθήματος στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO_3 και το διήθημα ογκομετρήθηκε.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίστηκε με θειικό αμμώνιο κορεσμού 41%, ύστερα από την προσθήκη θειικού αμμωνίου 90% με όγκο ίσο προς 0.837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος και στη συνέχεια το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία 4 °C για περίπου 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών το υπερκείμενο αποχύθηκε με την χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 5110 g για 40 min σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστον δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος. Τέλος ακολούθησε διαπίδυση σε θερμοκρασία 4 °C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος *Tris* 0.001M (pH 7.5), για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά το πέρας της διαπίδυσης το διάλυμα συλλέχθηκε και ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 34540 g για 15 min σε θερμοκρασία 0-4 °C. Ακολούθησε η προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης (β-μερκαπτοαιθανόλης) 0.3 M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος.

- EDTA 0.1 M, pH 7.0 με όγκο ίσο με 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά την προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης
- Διάλυμα Tris 2 M για ρύθμιση του pH στο 8.8.

Το μίγμα επώσθηκε σε θερμοκρασία 37 °C, σε υδατόλουτρο, για μία ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκε διάλυμα CH_3COOH 1 N για ρύθμιση του pH στο 7.0 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 34540 g για 10 min σε θερμοκρασία 0-4 °C και το υπερκείμενο ογκομετρήθηκε.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 mL AMP 0.1 M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης [η AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση του ενζύμου]. Το μίγμα αφέθηκε σε πάγο για 16 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η κρυστάλλωση της *rmGPb*. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση στις 28710 g για 10 min σε θερμοκρασία 0-4 °C. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C με όσο το δυνατό λιγότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (50:50:1, pH 6.8)

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρήθηκε στις 28710 g για 10 min σε θερμοκρασία 25-30 °C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολούθησε η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς έγινε στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφέθηκε ώστε να κρυσταλλώσει στους 0 °C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης δεξήχθησαν τουλάχιστον τρεις φορές με προσθήκη AMP, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, και δύο φορές απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της *rmGPb* αφού συλλέχθηκαν μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, διαλυτοποιήθηκαν με επώαση σε θερμοκρασία 30 °C. Ακολούθησε προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσης με φωτομέτρηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280 nm (ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για την *rmGPb* ισούται με 1.32). Τέλος προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20 °C (50 % v/v γλυκερόλη).

2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής GP (*hlGP*)

Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PYGL*) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης *pDEST-14*, σε κύτταρα *E. coli* BL-21 GOLD (*DE3*). Ο φορέας αυτός προσδίδει στην πρωτεΐνη μια αλληλουχία 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά την διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης. Το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης παρουσία των 6 ιστιδινών υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος *ProtParam* [102] στο 6.85 και στα 97.97 kD αντίστοιχα. Απουσία της ετικέτας συγγένειας οι ίδιες παράμετροι υπολογίστηκαν στο 6.71 και στα 97.2 kD αντιστοίχως (*UniProtKB-ID P06737*). Όλες η διαδικασίες χειρισμού βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επώσθηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο. Αρχικά, μικρή ποσότητα κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth*,

των 10 mL, στο οποίο προστέθηκαν 50 µg/mL αμπικιλίνη, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2$) και 100 mg/L πυριδοξίνη. Το υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth* (*Lysogeny broth*) παρασκευάστηκε κατά *Miller* και περιείχε 10 g NaCl, 10 g τρυπτόνη και 5 g εκχύλισμα ζύμης (*yeast extract*) για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες των 10 mL αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 37 °C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια τα 10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένη φλάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth*, όγκου 1 L (αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε επίσης 50 µg/mL αμπικιλίνη, 600 mg/L $MnCl_2$ και 100 mg/L πυριδοξίνη. Από το παραπάνω θρεπτικό-μίγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύναμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα, για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φασματοφωτομετρίας ($\lambda=600\text{ nm}$). Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C, 210 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm φτάσει σε τιμή 0.6-0.7. Στη συνέχεια οι φλάσκες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, *IPTG*, σε τελική συγκέντρωση 0.6 mM στην υγρή καλλιέργεια. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχώμενο ανακινούμενο επωαστήρα στους 18 °C, 210 rpm για 12 έως 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρωσης (250 mL) σε 4225 g, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε το ίζημα.

Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM *Imidazole* και 0.7 mM *PMSF*. Το *PMSF* προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 20 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο ως εξής: *amplitude* 65 %, 30 sec εφαρμογή υπερήχων/30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρωση για 1h:30min, 4 °C, σε 21130 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 µm και αφήσαμε το κυτταρόλυμα στον πάγο. Η απομόνωση της *hlGP* έγινε σε 3 βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος *AKTA-FPLC*. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε κατά τον καθαρισμό με το σύστημα *AKTA-FPLC* ήταν φιλτραρισμένα με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.45 µm και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

Πρώτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (*His-Trap*, *GE Healthcare*): Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM *imidazole* (διάλυμα A) με ροή 0.3 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 10 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*Wash*). Η έκκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιείχε 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 0.5 M *imidazole* (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με *SDS-PAGE* και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέ-

ντρωσης πρωτεϊνών και προστέθηκε πρωτεάση *TEV* σε αναλογία 1 *mg TEV* για 40 *mg* ολικής πρωτεΐνης. Μετά την προσθήκη της πρωτεάσης *TEV* το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 0.5 *M NaCl*, 20 *mM imidazole*, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C για 16 ώρες. Η διαπίδυση έγινε για να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο για δύο λόγους. Πρώτον, μια υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου δεν θα επέτρεπε την πρόσδεση της άτμητης πρωτεΐνης στο δεύτερο βήμα καθαρισμού. Δεύτερον, η πρωτεάση *TEV* απενεργοποιείται από το ιμιδαζόλιο. Σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 0.5 *M* η *TEV* χάνει την δραστηριότητα της ενώ παρουσία 50 *mM* ιμιδαζολίου άνακτα μόνο το 50 % της δραστηριότητας της. Για να μπορέσει η πρωτεάση να λειτουργήσει στο 100 % της δραστηριότητας της πρέπει η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου να είναι μικρότερη από 5 *mM* [103].

Δεύτερο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (*His-Trap*, *GE Healthcare*): Αρχικά έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά τη διαπίδυση. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 0.5 *M NaCl*, 20 *mM imidazole* (διάλυμα Α) με ροή 0.5 *mL/min*. Η εφαρμογή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 *mL/min* και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL*, στα οποία αναμενόταν να βρίσκεται η τμημένη πρωτεΐνη (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με ροή 0.5 *mL/min* με το διάλυμα Α και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL* (*wash*). Η έκλουση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 *mL/min* με διάλυμα που περιέχει 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 0.5 *M NaCl*, 0.5 *M imidazole* (διάλυμα Β) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 *mL*. Τα κλάσματα στα οποία βρισκόταν η τμημένη πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν και έγινε διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 0.25 *mM DTT*, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4°C, για 16 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί το *NaCl*.

Τρίτο βήμα: Στήλη ιοντοανταλλαγής *Resource Q* (*GE, HealtCare*): Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο *pH 7.5* η *hIGPa* έχει αρνητικό φορτίο και ως εκ τούτου μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως η στήλη *resource Q*. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 0.25 *mM DTT* (διάλυμα Α) με ροή 0.5 *mL/min*. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 *mL/min* και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL* (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα Α και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL* (*wash*). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 *mM Tris-HCl pH 7.5*, 1 *M NaCl*, 0.25 *mM DTT* (διάλυμα Β) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 *mL*. Πιο συγκεκριμένα η έκλουση έγινε για 40 *min*, από 0-40 % του διαλύματος Β, δηλαδή σε κάθε κλάσμα (1 *mL*) το *NaCl* αυξανόταν ανά 20 *mM*. Μετά το πέρας της έκλουσης με διαβάθμιση συγκέντρωσης έγινε εφαρμογή 100 % του διαλύματος Β ώστε να απομακρυνθούν οι ισχυρά προσδεδεμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Τέλος, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με *SDS-PAGE* και αυτά που περιείχαν τη *hIGP* σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 30000 *Daltons*, με φυγοκέντρηση, ώστε να γίνει στη συνέχεια φωσφορυλίωση από την γ καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης από μυϊκό ιστό κονίκλων (*rmPhK- γ -trunc*).

2.12 Απομόνωση της *rmPhK-γ-trunc*

Το γονίδιο της μυϊκής γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου απο κόνικλο (*rmPhK-γ-trunc*) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης *pGEX-6p1*, σε κύτταρα *E. coli B834 plyss*. Ο φορέας αυτός προσδίδει στην πρωτεΐνη μια επικράτεια γλουταθειόνης (*GST*) στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης. Αυτή η πρωτεϊνική χίμαιρα θα αναφέρεται παρακάτω ως *GST-rmPhK-γ-trunc*.

Όλες η διαδικασίες χειρισμού βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επώαστηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο. Αρχικά, μικρή ποσότητα κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth* κατά *Miller (AppliChem)*, των 10 mL, στο οποίο προστέθηκαν 50 µg/mL αμπικιλίνη, 34 µg/mL χλωραμφενικόλη. Αυτές οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια 10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένη φιάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth*, όγκου 1 L (αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις σε αντιβιοτικά. Από το παραπάνω θρεπτικό-μείγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύνουμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 37 °C, 210 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm φτάσει σε τιμή 0.6-0.7. Στη συνέχεια οι φιάσκες τοποθετηθήκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, *IPTG*, σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχόμενο ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 18 °C, 210 rpm για 12 έως 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες τοποθετηθήκαν σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (250 mL) σε 4225 g, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε το ίζημα.

Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα που περιείχε 50 mM *Hepes*, 0.2 M *NaCl*, 0.1 % *MTG*, 5 % γλυκερόλη (v/v) και 1 mM *PMSF*, pH 8.2. Το *PMSF* προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 20 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο ως εξής: *amplitude* 70%, 30 sec εφαρμογή υπερήχων/30 sec παύση για 3 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση για 1h:30min, 4 °C, 21130 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45 µm και αφήσαμε το κυτταρόλυμα στον πάγο. Η απομόνωση της *rmPhK-γ-trunc* έγινε σε 3 βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος *AKTA-FPLC*.

Πρώτο βήμα: Στήλη συγγένειας *GST* (*Protino GST 4B*, *Macherey-Nagel*)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 50 mM *KH₂PO₄*, 0.2 M *NaCl*, 0.1 % *MTG*, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη

έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (*wash*). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διάλυμα που περιείχε 50 mM KH_2PO_4 , 0.2 M NaCl, 0.1 % (w/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη και 20 mM GSH, pH 8.2 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά τα οποία περιείχαν την GST-rmPhK- γ -trunc συγκεντρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα προστέθηκε η πρωτεάση 3C σε αναλογία 1 προς 20 με την ποσότητα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό μίγμα έμεινε σε θερμοκρασία 4 °C, για 12 έως 16 ώρες. Αφού γίνει τμήση της ετικέτας συγγένειας, θα παραχθεί GST, GST-rmPhK- γ -trunc, όπου δεν επετεύχθη η τμήση, και rmPhK- γ -trunc χωρίς ετικέτα συγγένειας. Δεύτερο βήμα: Στήλη συγγένειας HiTrap Blue sepharose HP (Cibacron Blue F3G-A, GE HeathCare).

Στη συνέχεια έγινε αραίωση του δείγματος με διάλυμα που περιείχε 50 mM KH_2PO_4 , 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 σε αναλογία 1:4, ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 50 mM. Η διαδικασία αυτή γίνεται γιατί σε συγκέντρωση NaCl 200 mM η πρωτεΐνη δεν θα μπορέσει να προσδεθεί στη στήλη. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM NaCl, 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (*wash*). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε σε δύο βήματα με διάλυμα που περιείχε 50 mM KH_2PO_4 , 2 M NaCl, 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Αρχικά έγινε έκλουση με 50 % διαλύματος B (1 M NaCl) και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή 100 % διαλύματος B (2 M NaCl). Ακολούθως έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν και εφαρμόστηκαν σε στήλη βαρύτητας GST, όπως αναλύεται παρακάτω.

Τρίτο βήμα: Στήλη συγγένειας GST βαρύτητας (Macherey-Nagel)

Τα διαλύματα A και B που χρησιμοποιήσαμε είναι τα ίδια με την στήλη GST από το πρώτο βήμα. Το πρωτεϊνικό διάλυμα από το δεύτερο βήμα εφαρμόστηκε σε στήλη βαρύτητας της οποίας το υλικό αποτελούταν από σφαιρίδια που είχαν προσροφημένη γλουταθειόνη και είχαν εξισορροπηθεί με το διάλυμα A. Η rmPhK- γ -trunc περιμένουμε να μην προσδεθεί στα σφαιρίδια και να απομακρυνθεί στο *flow through*, ενώ η πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα GST, θα πρέπει να συνδεθεί πάνω στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε πλύση της στήλης με διάλυμα A και έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών με το διάλυμα B.

Ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συμπύκνωση του κλάσματος που περιείχε την rmPhK- γ -trunc με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10000 Da. Στη συμπυκνωμένη πρωτεΐνη προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (50 % τελική συγκέντρωση) και φυλάξαμε την πρωτεΐνη σε θερμοκρασία -20 °C.

2.13 Φωσφορυλίωση της GP

Η φωσφορυλίωση της GP γίνεται, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, από την PhK και συγκεκριμένα από την γ -καταλυτική της υπομονάδα στη Ser14 της GP.

2.14 Φωσφορυλίωση της *rmGPb*

Η *rmGPb* φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C σε διάλυμα που περιέχει 50 % γλυκερόλη (ν/ν) και 50 % ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει:

- | | |
|--|-----------|
| <ul style="list-style-type: none">- 50 mM β-φωσφορική γλυκερόλη- 50 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη- 1 mM EDTA | $pH\ 6.8$ |
|--|-----------|

Αρχικά, έγινε παρασκευή μιας αραιώσης της *rmGPb* (πρώτη αραιώση) καθώς και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αραιωμένου ενζύμου με φασματοφωτομετρία υπεριώδους φωτός σε μήκος κύματος 280 nm. Μεταφέραμε 20 μL από το πυκνό διάλυμα της *rmGPb* (-20°C) σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, απουσία ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό για να μηδενίσουμε την απορρόφηση του φασματοφωτομέτρου σε μήκος κύματος 280 nm, ώστε η απορρόφηση που θα καταγράψουμε να οφείλεται στην παρουσία της πρωτεΐνης. Η τιμή που προέκυψε ήταν έξτος των ορίων γραμμικότητας και έτσι πραγματοποιήσαμε δύο επιπλέον αραιώσεις ώστε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της πρώτης αραιώσης. Έτσι λοιπόν κάναμε τις εξής επιπλέον αραιώσεις:

- Δεύτερη αραιώση: 100 μL από την πρώτη αραιώση + 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Αφού μηδενίσαμε με το τυφλό σε μήκος κύματος 280 nm (1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1), μετρήσαμε την απορρόφηση η οποία ήταν 0.290. Η απορρόφηση αυτή διαιρέθηκε με το συντελεστή μοριακής απορρόφησης για τη φωσφορυλίωση ο οποίος ισούται με 1.32. Επομένως η συγκέντρωση της δεύτερης αραιώσης ήταν

$$\frac{0.290}{1.32} = 0.22\ \text{mg/mL},$$

Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της πρώτης αραιώσης ήταν:

$$\frac{0.22\ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 1000\ \mu\text{L}}{100\ \mu\text{L}} = 2.2\ \text{mg/mL}$$

- Τρίτη αραιώση: 200 μL από την πρώτη αραιώση + 800 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Με όμοιο τρόπο με πριν η συγκέντρωση της τρίτης αραιώσης βρέθηκε να είναι

$$\frac{0.539}{1.32} = 0.44\ \text{mg/mL}$$

Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της πρώτης αραιώσης ήταν:

$$\frac{0.44\ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 1000\ \mu\text{L}}{200\ \mu\text{L}} = 2.2\ \text{mg/mL},$$

Επομένως, η δεύτερη και η τρίτη αραιώση που κάναμε απέδειξαν ότι η συγκέντρωση της αρχικής αραιώσης ήταν 2.2 mg/mL

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης έγινε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris, 50 mM Hepes, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT και 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 8.2. Έκτος από το ρυθμιστικό διάλυμα η αντίδραση έγινε παρουσία 2 mM ATP, 5 ng/mL *rmPhK-γ-trunc* και 0.5 mg/mL *rmGPb*. Η *rmPhK-γ-trunc* αραιώθηκε αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris, 50 mM Hepes, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT και 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 8.2, παρουσία 5 mg/mL BSA και στη συνέχεια προστέθηκε στην αντίδραση. Επομένως, το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη φωσφορυλίωση περιέχει επιπλέον BSA. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 4 ώρες σε σκοτάδι και έπειτα ο τερματι-

σμός της αντίδρασης έγινε με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο. Ο όγκος της φωσφορυλίωσης ήταν τέτοιος, ώστε να φωσφορυλιωθεί όλη η πρώτη αραίωση της *rmGPb* που παρασκευάσαμε, και να έχει τελική συγκέντρωση 0.5 mg/mL στην αντίδραση φωσφορυλίωσης.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της φωσφορυλίωσης έγινε με μέτρηση της διαφοράς που εμφάνισε η δραστηριότητα της *rmGPa* παρουσία και απουσία 1 mM AMP σε 20 mM υποστρώματος (*GIP*). Η ενεργοποίηση της *mGPb* γίνεται μόνο παρουσία AMP καθώς μετατοπίζεται η ισορροπία από την *T* στην *R* διαμόρφωση. Η προσθήκη της AMP στην ήδη ενεργή *rmGPa* οδηγεί σε μια αύξηση στη δραστηριότητα του ενζύμου της τάξης του 10 με 20 %. Αντίθετα, η προσθήκη AMP στη *hlGPa* δεν οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της δραστηριότητας της [104]. Επομένως μια διαφορά έως 20 % παρουσία και απουσία AMP δηλώνει ότι η φωσφορυλίωση της *rmGPb* έγινε με επιτυχία.

2.15 Φωσφορυλίωση και ποσοτικοποίηση της *hlGPb* με SDS-PAGE

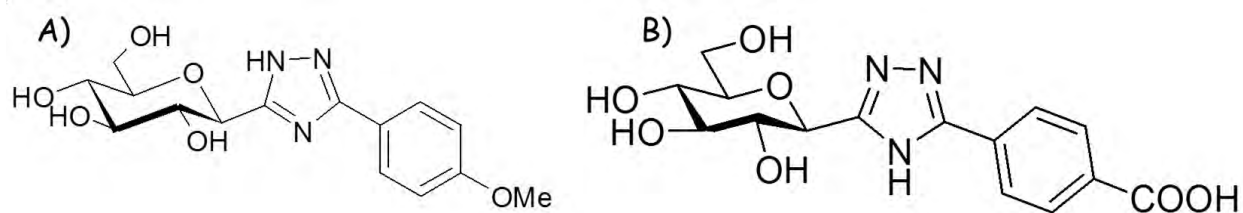
Η φωσφορυλίωση της *hlGPb* που απομονώθηκε έγινε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris, 50 mM Hepes, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT και 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 8.2. Εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα η αντίδραση έγινε παρουσία 0.5 mM ATP, 5 ng/mL *rmPhK-γ-trun*, 0.16 mg/mL *hlGPb* και 5 mM MgCl_2 . Η *rmPhK-γ-trun* αραιώθηκε αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris, 50 mM Hepes, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT και 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 8.2, παρουσία 5 mg/mL BSA και στη συνέχεια προστέθηκε στην αντίδραση. Επομένως το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη φωσφορυλίωση περιέχει επιπλέον BSA. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 1h:30min στο σκοτάδι και έπειτα ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο. Μετά τη φωσφορυλίωση έγινε διαπίδυση του πρωτεϊνικού μίγματος έναντι διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA και 100 mM NaCl. Τέλος, η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε σε όγκο 400 μL με χρήση φίλτρου συμπύκνωσης με κατώφλι 30000 Da.

Επειδή μετά τη φωσφορυλίωση της *hlGP* ακολούθησε διαπίδυση και συμπύκνωση δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αλλά ούτε να προσδιορίσουμε με φασματοφωτομετρία τη συγκέντρωση της *hlGPa*, διότι δεν μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα της πρωτεΐνης που χάθηκε στα παραπάνω στάδια. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε ως διάλυμα αναφοράς την *rmGPb*, της οποίας τη συγκέντρωση μπορούμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια (βλ. εδάφιο 2.14), για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της *hlGPa*. Συγκεκριμένα παρασκευάσαμε μια πηκτή πολυακρυλαμίδης 10 %, 10 θέσεων, υπό αποδιατακτικές συνθήκες όπου εφαρμόσαμε 0.25 μg , 0.5 μg , 1 μg , 2 μg και 3 μg από την *rmGPb*. Στη συνέχεια αφήσαμε μια διαδρομή κενή και ακολούθως εφαρμόσαμε 3 μL από την συμπυκνωμένη *hlGPa*. Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος *Image J* σχεδιάσαμε μια καμπύλη ποσοτικοποίησης, με βάση τις εντάσεις των ζωνών της *rmGPb* σε κάθε διαδρομή, και τις συγκρίναμε με την ένταση της ζώνης που εμφάνισε η *hlGPa*.

2.16 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Όπως έχουμε αναφέρει στο εδάφιο 1.5, η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε *in vitro* έναντι της φωσφορυλάσης

του γλυκογόνου μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την *GIP*. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος [105, 106]. Επειδή στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε την *rmGPa* και την *hlGPa*, έπρεπε αρχικά να γίνει φωσφορυλίωση των *rmGPb* και *hlGPb*, ώστε να μεταβούν από την ανενεργή κατάσταση *b* στην δραστική *a*. Οι χημικές ενώσεις που μελετήθηκαν αποτελούν ανάλογα γλυκόζης και συντέθηκαν σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του καθηγητή *Somsák László*, στο Πανεπιστήμιο του *Debrecen* της Ουγγαρίας. Ο σχεδιασμός των πιθανών αυτών αναστολέων έγινε με βάση την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου. Οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν, *KS252* και *JL H270* παρουσιάζονται στην *Εικόνα 29*.



Εικόνα 29: Οι χημικές δομές των αναστολέων A) *JL H270* και B) *KS252*. Η διαφορά τους βρίσκεται στον υποκαταστάτη της ομάδας του φαινυλίου.

Οι αναστολείς αυτοί είναι C-β-D γλυκοπυρανόζυλο-τριαζόλια που διαθέτουν μια ομάδα φαινυλίου, επομένως ο *C1* της γλυκόζης έχει διαμόρφωση β και όχι α. Η διαφορά μεταξύ των δύο ενώσεων βρίσκεται στον υποκαταστάτη που υπάρχει στην ομάδα του φαινυλίου. Στον *KS252* υπάρχει η ομάδα *-COOH* ενώ στον *JLH270* η ομάδα *-OCH₃*. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες οδήγησαν αντίστοιχα στον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (*K_i*) του κάθε αναστολέα ως προς την *rmGPa* και στον προσδιορισμό του τρόπου πρόσδεσης στο ένζυμο. Ο πιο βιο-δραστικός αναστολέας μελετήθηκε επίσης έναντι της *hlGPa*.

2.16.1 Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια

45 g γλυκογόνο διαλυτοποιήθηκαν σε όγκο 900 mL απιονισμένου ύδατος με ανάδευση με υάλινη ράβδο. Στο διάλυμα προστεθήκαν 2 g ζωάνθρακα και ακολούθησε ανάδευση για 10 min με υάλινη ράβδο. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 4225 g σε θερμοκρασία 8 °C για 10 min. Η διαδικασία επεξεργασίας με ζωάνθρακα επαναλήφθηκε δύο φορές. Φιλτράραμε το υπερκείμενο διάλυμα με συσκευή διήθησης υπό κενό. Το διήθημα αφού τοποθετήθηκε σε πάγο και προστέθηκε 1.5 όγκος απόλυτης αιθανόλης (όγκος αιθανόλης = όγκος διαλύματος γλυκογόνου × 1.5) έμεινε σε πάγο για 15 min. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 4225 g, σε θερμοκρασία 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε (αν ήταν θολό γινόταν φιλτράρισμα) και φιλτράραμε το ίζημα υπό κενό και στη συνέχεια το ξεπλύνουμε με απόλυτη αιθανόλη. Το ίζημα λυοφιλοποιήθηκε, ζυγίσαμε το γλυκογόνο και προσθέσαμε ανάλογο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε να προκύψει διάλυμα 10 % w/v.

2.16.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης.

Γίνεται παρασκευή των διαλυμάτων:

- Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό NaOH και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά.

Αφού ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα και έγινε η ρύθμιση του pH, αναμίξαμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Αφήσαμε το μίγμα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προσθέσαμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm [106]. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, πρέπει να παρασκευάσουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα.

2.16.3 Ενζυμικό διάλυμα

Η συγκέντρωση της rmGPa που είχε παρασκευαστεί έπειτα από φωσφορυλίωση με την γ-καταλυτική υπομονάδα της PhK ήταν 0.5 mg/mL (βλ. εδάφιο 2.14) και για την hlGPa 0.080 mg/mL (βλ. εδάφιο 3.1.3). Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση 25 μg/mL για την rmGPa και 5 μg/mL για την hlGP σε όγκο 240 μL ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν 180 μL, να είχαμε 5 μg/mL rmGPa και 1 μg/mL hlGP, όπως αναλύεται στο εδάφιο 2.16.5. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε GPa, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 σε αναλογίες:

Ποσότητες και αρχικές συγκεντρώσεις		Τελικές συγκεντρώσεις	
rmGPa	rmGPa	rmGPa	hlGPa
24 μL γλυκογόνο 10 %		1 % γλυκογόνο	
12 μL ρυθ.δ/μα 50:50:1, pH 6.8	12 μL ιμιδαζόλιο 3M pH 7.5	Ρυθ. δ/μα 2.5:2.5:0.05	150 mM ιμιδαζόλιο
12 μL rmGPa 0.5 mg/mL,	15 μL 0.080 mg/mL hlGPa	25 μg/mL GPa,	5 μg/mL hlGPa
192 dH ₂ O	189 μL dH ₂ O		
V _{τελ.} : 240 μL			

Αφήσαμε το ενζυμικό διάλυμα σε θερμοκρασία 30 °C σε υδατόλουτρο για 15 min ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.16.4 Διαλύματα υποστρωμάτων

Όπως αναφέραμε, στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε, μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή της προσθήκη της *GIP* στο μακρομόριο του γλυκογόνου. Επομένως, το υπόστρωμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η α -D-1-φωσφορική γλυκόζη. Οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος που μελετήσαμε βρίσκονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 το οποίο περιέχει 270 mM KCl, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA και το παρασκευάσαμε με αραίωση από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 που περιέχει 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Αρχικά, παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα *GIP* με συγκέντρωση 400 mM στο οποίο ρυθμίσαμε το pH στο 6.8 και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία -20 °C, αφού πρώτα το διαμοιράσαμε σε κλάσματα των 500 μ L. Από τα 400 mM παρασκευάσαμε *GIP* με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές ποσότητες και συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
225 μ L <i>GIP</i> 400mM	90 mM <i>GIP</i>
675 μ L ρυθ. δ/μα αραίωσης 1 pH 6.8	Ρυθ. δ/μα αραίωσης 2
100 μ L dH ₂ O	
V _{τελ.} : 1000 μ L	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις *GIP* που χρησιμοποιήσαμε παρασκευάστηκαν με αραίωση από την *GIP* 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 2, όπως φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 2. Οι συγκεντρώσεις της *GIP* ήταν 1.5, 2, 3, 4, 6, 10, (20 mM \pm 1 mM AMP) για την *rmGPa*, ενώ για την *hlGPa* ήταν 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 mM σε 180 μ L της αντίδρασης όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Παρασκευή των πυκνών διαλυμάτων των υποστρωμάτων

<i>GIP</i> 90 mM (μ L)	Ρυθ. δ/μα αραίωσης 2 pH 6.8 (μ L)	Συγκέντρωση της αραιωμένης <i>GIP</i> (mM)	[<i>GIP</i>] mM στα 180 μ L της αντίδρασης
25	975	2.25	0.5
50	950	4.5	1
75	925	6.75	1.5
100	900	9	2
150	850	13.5	3
200	800	18	4
250	750	22.5	5
300	700	27	6
500	500	45	10
1000	-	-	20
V _{τελ.} : 1000 μ L			

Η *GPa* είναι ενεργή και παρουσία υποστρώματος βρίσκεται στην R-στερεοδιαμόρφωση με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται κάποιον αλλοστερικό ενεργοποιητή (AMP) για να ενεργοποιηθεί,

όπως συμβαίνει με την *GPb* (αλλοστερική μετάπτωση από την *T* στην *R*). Επομένως, τα διαλύματα υποστρωμάτων περιείχαν *GIP*, dH_2O και *DMSO* ή αναστολέα, όπου χρησιμοποιήθηκε όπως παρουσιάζεται στον Πινάκα 3.

Οι αναστολείς διαλυθήκαν σε κατάλληλο όγκο *DMSO* ώστε να έχουν συγκέντρωση 100 mM. Έπειτα με διαδοχικές αραιώσεις (της τάξης των μM) μειώσαμε τη συγκέντρωση του *DMSO* σε 10 % (v/v), ώστε στην αντίδραση να έχουμε 2 % (v/v) *DMSO* όπως αναλύεται παραπάνω. Η K_M του ενζύμου στην περίπτωση αυτή προσδιορίστηκε παρουσία 2 % (v/v) *DMSO*. Για τον προσδιορισμό των $K_{M(app.)}$ χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, όπως και στον προσδιορισμό της K_M , αλλά κάθε φορά το πείραμα έγινε παρουσία μίας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα. Ο προσδιορισμός της K_i έγινε με τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Για τον *KS252* μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις αναστολέα 0 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 0.8 mM, 1 mM και 1.2 mM. Για τον αναστολέα *JLH270* έναντι της *rmGPa* μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0 μM , 1.5 μM , 2 μM , 3 μM , 5 μM και έναντι της *hlGPa* 0 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 8 μM 10 μM .

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για περίπου 4 min πριν τη λήξη των 15 min επώασης του ενζυμικού διαλύματος ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ένζυμο. Οι *GIP* στα 144 μL βρίσκονται αραιωμένες σε 75 mM *KCl*, 37.5 mM *imidazole*, 0.75 mM *DTT*, 0.75 mM *EDTA* και 2.5 % *DMSO*.

Πινάκας 3: Παρασκευή των διαλυμάτων των υποστρωμάτων

<i>GIP</i> (από stock mM)	40 μL (2.25)	40 μL (4.5)	40 μL (6.75)	40 μL (9)	40 μL (13.5)	40 μL (18)	40 μL (22.5)	40 μL (27)	40 μL (45)	40 μL (90)
dH_2O μL	68	68	68	68	68	68	68	68	68	68
<i>Inhibitor</i> (10% <i>DMSO</i>)	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
V _{τελ} : 144 μL										
Συγκεντρώσεις <i>GIP</i> στα 144 μL										
(mM)	0.625	1.25	1.875	2.5	3.75	5	6,25	7.5	12.5	35
Συγκεντρώσεις <i>GIP</i> στα 180 μL της αντίδρασης										
(mM)	0.5	1	1.5	2	3	4	5	6	10	20

* Η *GIP* προστέθηκε τελευταία για να αποφευχθεί η φυσική της υδρόλυση

** Η συγκέντρωση του αναστολέα ήταν σταθερή κάθε φορά και μεταβάλλονταν οι συγκεντρώσεις *GIP*

2.16.5 Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της K_M λάβαμε 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα και τα προσθέσαμε στα 144 μL του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης ίσο με 180 μL . Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος στα 180 μL της αντίδρασης ήταν pH 6.8, 30 °C, 60 mM *KCl*, 30 mM *Imidazole*, 0.6 mM *DTT*, 0.6 mM *EDTA*, 1 % ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 για την *rmGPa* (0.5 mM β-φωσφορική γλυκερόλη, 0.5 mM β-Μερκατοαιθανόλη), 0.2 % (w/v) γλυκογόνο και 2 % (v/v) *DMSO*. Οι συγκεντρώσεις της *GIP* ήταν 1.5, 2, 3, 4, 6, 10, 20 mM για την *rmGPa*, ενώ για την *hlGPa* ήταν 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 mM. Στη συνέχεια του πειράματος, για την *rmGPa*, πήραμε 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 1, 2, 3, 4 min, και τα αποθέσαμε σε 10 μL *SDS* 1 %. Κα-

τόπιν κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση. Για την *hlGP* ο χρόνοι που σταματήσαμε την αντίδραση ήταν 4, 6, 9, και 12 *min*. Αφού τελειώσαμε με όλες τις συγκεντρώσεις της *GIP*, τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C. Για τον προσδιορισμό των $K_{M(app.)}$ το παραπάνω πείραμα έγινε παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά. Για τον προσδιορισμό της K_i απαιτούνται τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Στη συνέχεια, παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση. Έτσι, παρασκευάσαμε τα παρακάτω διαλύματα εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10 μL SDS 1 % (w/v):

Τυφλό H_2O	40 μL dH_2O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	32 μL dH_2O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό <i>GIP</i>	31.1 μL dH_2O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση <i>GIP</i> , συνήθως 45 <i>mM</i>
Τυφλό φωσφορικών	30 μL dH_2O + 10 μL <i>Pi</i> 1 <i>mM</i>

Επομένως σε 40 μL των τυφλών είχαμε 5 $\mu\text{g/mL}$ *rmGPa* (0.2 % γλυκογόνο, 1 % ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1) ή 1 $\mu\text{g/mL}$ *hlGPa* (0.2 % (w/v) γλυκογόνο, 30 *mM* ιμιδαζόλιο) 10 *mM* *GIP* και 0.25 *mM* *Pi*. Από την απορρόφηση που πήραμε για τα 10 *mM* *GIP*, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.16.2. Μετά τα 15 *min* επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 500 μL διαλύματος φωτομέτρησης. Στη συνέχεια κάναμε ανάδευση και τα τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 15 *min* ώστε να δημιουργηθεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο.

Τέλος μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 850 *nm* αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του dH_2O . Παρ’ ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής σε όξινο *pH*, στο *pH* 5.0 είναι αρκετά σταθερή. Οπότε, αυτή η φασματοφωτομετρική μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φωσφόρου που παράγεται κατά την αντίδραση της *GP* που μελετήσαμε [106].

2.16.6 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit* [107]. Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (K_M , V_{max} , K_i) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστικότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστικότητα ορίζεται ως τα μmol υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε *mg* πρωτεΐνης, δηλαδή

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$$

Για να υπολογίσουμε την ειδική δραστικότητα από τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τα μmol φωσφορικών που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών το οποίο είχε συγκέ-

ντρωση 0.25 mM, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο εδάφιο 2.16.5. Τα 0.25 mM φωσφορικών αντιστοιχούσαν σε 0.01 μmol φωσφορικών, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol/L} = 0.25 \mu\text{mol/mL}$$

Άρα στα 1000 μL περιέχονταν 0.25 μmol φωσφορικών. Επομένως, στα 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των φωσφορικών που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01 μmol φωσφορικών. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των φωσφορικών είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μmol φωσφορικών. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των φωσφορικών σε μmol για κάθε δείγμα.

Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μmol φωσφορικών που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την GIP. Έτσι, η απορρόφηση των φωσφορικών ισούταν με:

$$(B - Abs_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - Abs_{\text{τυφλού GIP}}) = Abs_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μmol έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μmol των φωσφορικών στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{C \times 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A \times 100} = \mu\text{mol φωσφορικών στο άγνωστο δείγμα}$$

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μη γραμμική εξίσωση λαμβάνοντας υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f.

Όπου,

$$limit = 0.78 \cdot [GIP] \cdot \text{assay volume}$$

0.78 είναι το % (78%) ποσοστό της GIP που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία.

[GIP] η συγκέντρωση της GIP στην αντίδραση

Assay volume: Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μL)

Και,

$$f = \frac{limit}{\text{assay volume} \cdot C}$$

C, η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με $5 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ για τη rmGPa και με $1 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ για τη hGPa.

Άρα συνολικά:

$[GIP]_{final} (mM)$	$rmGPa$		$hlGPa$	
	<i>Limit</i>	<i>f</i>	<i>Limit</i>	<i>f</i>
0.5	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε	0.0156	390
1	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε	0.0312	780
1.5	0.0468	234	0.0468	1170
2	0.0624	312	0.0624	1560
3	0.0936	468	0.0936	2340
4	0.1248	624	-	-
5	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε	0.156	3900
6	0.1872	936	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε
10	0.312	1560	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε
20	0.624	3120	Δεν υπολογίστηκε	Δεν υπολογίστηκε

Για τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* (K_M , mM) και των φαινομενικών σταθερών *Michaelis-Menten* ($K_{m(app.)}$, mM) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *Michaelis-Menten*:

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

v : ταχύτητα

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα

$[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος

K_M : σταθερά *Michaelis-Menten*.

Τέλος, έγινε η καμπύλη (*non linear fit*) $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η K_M και οι $K_{M(app.)}$ υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου *Lineweaver-Burk* [84], όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο εδάφιο 1.7.2. Για τον υπολογισμό της K_i , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι $K_{M(app.)}$ παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον yy' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των $K_{M(app.)}$ και στον xx' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (*linear fit*) υπολογίστηκε η K_i στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα xx' , το σημείο αυτό ισούται με το $-K_i$. Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:

$$y = ax + b$$

όπου,

a είναι η κλίσης της ευθείας (*gradient ή slope*)

b είναι η τεταγμένη επί της αρχής (*intercept*)

2.17 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

2.17.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων της *rmGPb*

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι της *rmGPb* (*T-διαμόρφωση*) θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει *AMP*, διότι όπως αναφέραμε, η *AMP* μετατοπίζει την ισορροπία προς την ενεργό *R* στερεοδιαμόρφωση. Για τον λόγο αυτό ακολουθήθηκε διαδικασία για την απομάκρυνση του από την πρωτεΐνη.

Το διάλυμα του ενζύμου υπέστη διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος *BES*, *pH* 6.7 που

αποτελούνταν από 10 mM BES, 1 mM EDTA, 0.02 (w/v) % NaN₃, 2 mM DTT και στο οποίο είχε προστεθεί ενεργός ζωάνθρακας. Η διαπίδυση έγινε αρχικά για περίπου 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, για να αποφευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου και ακολούθως για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C. Ο ενεργός ζωάνθρακας προστέθηκε σε αναλογία: 1 mg ανά μισό mg πρωτεΐνης. Πριν την προσθήκη έγινε πλύση της ποσότητας του ενεργού ζωάνθρακα με το ρυθμιστικό διάλυμα BES και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση και αποχύσαμε το υπερκείμενο. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα BES και προστέθηκε στο διάλυμα της διαπίδυσης. Η διαδικασία αυτή γίνεται ώστε ο ενεργός ζωάνθρακας κατά την προσθήκη του στη διαπίδυση να έχει ίδιο pH με το ρυθμιστικό διάλυμα.

Μετά το πέρας των 16 h της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε κατεργασία με προσθήκη ενεργού ζωάνθρακα απευθείας στο ενζυμικό διάλυμα, στην ίδια αναλογία, για την απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων. Και σε αυτή τη περίπτωση έγιναν πρώτα δυο πλύσεις του ζωάνθρακα με το ρυθμιστικό διάλυμα BES και έπειτα προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα και ακλούθησε ήπια ανάδευση για 15 min. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση, φυλάξαμε το υπερκείμενο και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm αφού πρώτα έγινε φιλτράρισμα από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45 μm ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ενεργού ζωάνθρακα. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι < 0.53. Εάν ο λόγος ήταν υψηλότερος, γινόταν επανάληψη της διαδικασίας την προσθήκης ενεργού ζωάνθρακα στο πρωτεϊνικό διάλυμα.

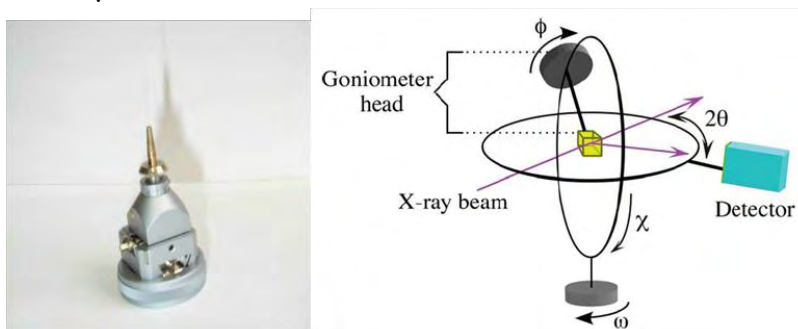
Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίνεται ο χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T- διαμόρφωση) έγινε σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων rmGPb, η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας συμμετρίας χώρου P4₃2₁2) εντός μικρών υάλινων σωλήνων. Οι σωλήνες αυτοί είχαν μήκος περίπου 3 cm, εσωτερική διάμετρο 2-3 mm, με τα άκρα τους καλά κλειστά με parafilm. Οι συνθήκες στις οποίες έγινε ανάπτυξη των κρυστάλλων της rmGPb ήταν: 25 mg/mL rmGPb με ρυθμιστικό διάλυμα BES pH 6.7, παρουσία 1 mM σπερμίνης, 6 mM IMP και 3 mM DTT στους 16 °C.

2.17.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.17.1 χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη αναστολέων στην GP. Κρύσταλλος της rmGPb (T-στερεοδιαμόρφωση) εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που περιείχε 10 mM αναστολέα, 15 % DMSO, 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα BES (10 mM BES, 1 mM EDTA, 0.02 % (w/v) NaN₃ και 2 mM DTT, pH 6.7) σε τριχοειδή σωλήνα και επώαστηκε σε αυτό το διάλυμα για 5 ώρες. Ο κρύσταλλος που βρισκόταν μέσα στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετήθηκε στο γωνιόμετρο και όλο το σύστημα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη κατάλληλη υποδοχή (γωνιόμετρο) ανάμεσα στον ανιχνευτή και την πηγή της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίστηκε ως προς την διεύθυνση

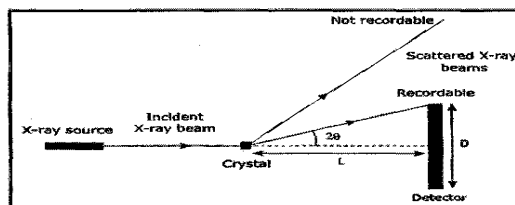
της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιόμετρου.

Η έκθεση του μονοκρυστάλλου της πρωτεΐνης σε ακτίνες-X, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία X και την απελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας μετρήθηκε με ειδικούς ανιχνευτές και διεξήχθη συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Αυτά τα περιθλασιγράμματα αποτέλεσαν τα πειραματικά δεδομένα τα οποία στη συνέχεια επεξεργάστηκαν για τη μέτρηση της έντασης των αμαυρώσεων οι οποίες σταθμίστηκαν και συγχωνεύτηκαν με κατάλληλα λογισμικά ώστε να υπολογιστεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.



Εικόνα 30: Αριστερά, φαίνεται ο τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο. Δεξιά, παρατηρούμε ένα σύστημα γωνιών σε πείραμα περίθλασης. Ο κρύσταλλος στο κέντρο είναι τοποθετημένος στην κορυφή (head) του γωνιόμετρου [77].

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 εικόνων. 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. Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων-X.



Εικόνα 31: 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 το 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.

Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

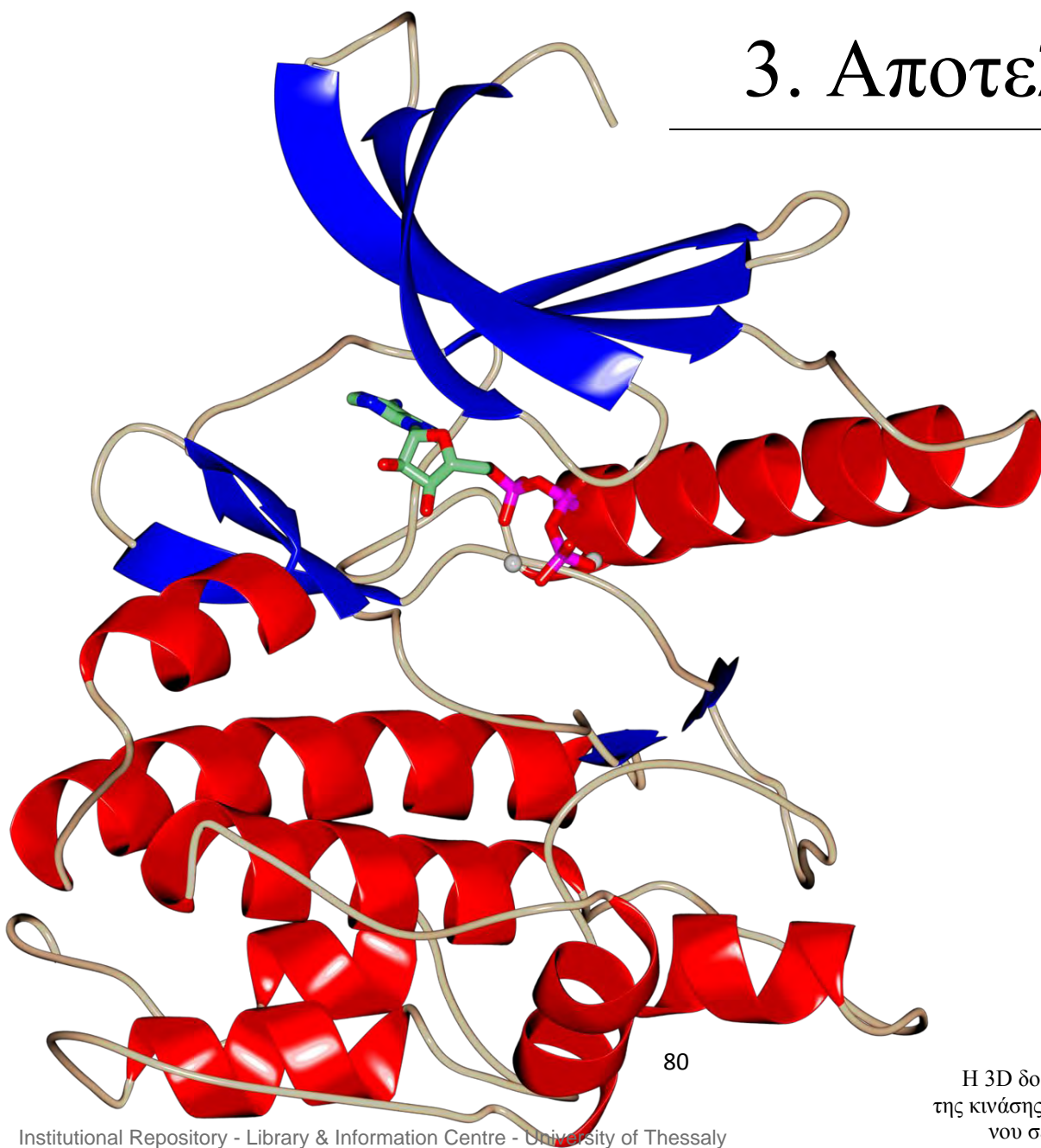
Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της *T* διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου (Leonidas et al, unpublished) με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC [108, 109] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [110]. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί πε-

ριορισμοί 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 %) επιλέχθηκε 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. Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα *Coot* [111, 112] και βελτιστοποίησης με το *REFMAC* [108, 109]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη $2F_{obs}-F_{calc}$ όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 1.6.6. Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (*refinement*) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν με τη βοήθεια του προγράμματος *ChemDraw*. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας $F_{obs}-F_{calc}$ και $2F_{obs}-F_{calc}$, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονική πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων *CCP4* [110]. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (*positional refinement*) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (*B factor*). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας $F_{obs}-F_{calc}$ και $2F_{obs}-F_{calc}$. Η δομή του συμπλόκου *GPb*-αναστολέων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με τα αμινοξέα που απαρτίζουν καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *CONTACT* του *CCP4* με όριο απόστασης 3.35 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών *CCP4 Molecular Graphics (mg)* για την απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων [113].

3. Αποτελέσματα



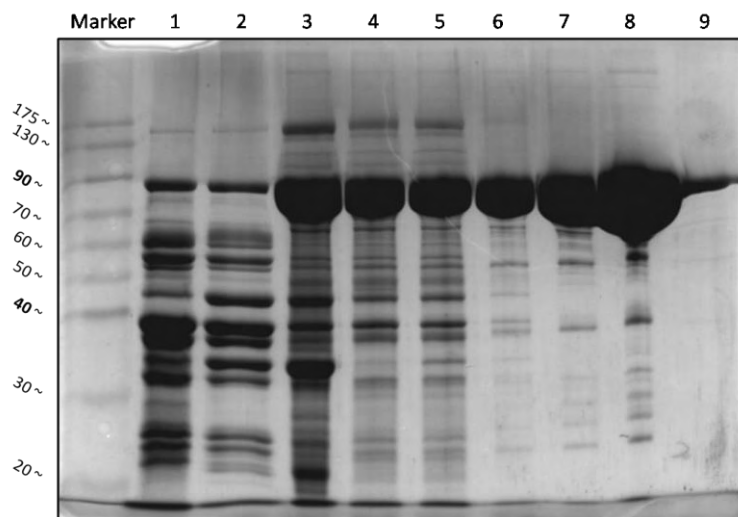
Η 3D δομή της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε σύμπλοκο με ATP και ιόντα Mg^{2+} (γκρι), PDB-ID: 1PHK

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της *rmGP*

Η απομόνωση της *rmGP* έγινε από συνολικά 2.094 kg σκελετικούς μύες κονίκλων. Στην *Εικόνα 32* παρουσιάζεται πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.



Εικόνα 32: 10 % SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: μετά την ολοκλήρωση του πρώτου βήματος, διαδρομή 2: μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, διαδρομή 3: πριν τη διαπίδυση, Διαδρομή 4: με τα διαπίδυση και τη φυγοκέντρωση, διαδρομή 5: πριν την πρώτη κρυστάλλωση, διαδρομή 6: μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: μετά τη δεύτερη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 8: μετά την τρίτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 9: τελικό προϊόν.

Παρατηρούμε πως ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η *rmGPb*, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρωση. Τέλος, στη διαδρομή 9, φαίνεται πως η καθαρότητα της φωσφορυλάσης είναι περισσότερη από 95 %, κάτι το οποίο επιτρέπει τη συνέχεια των περαιτέρω διαδικασιών ώστε να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του ένζυμου.

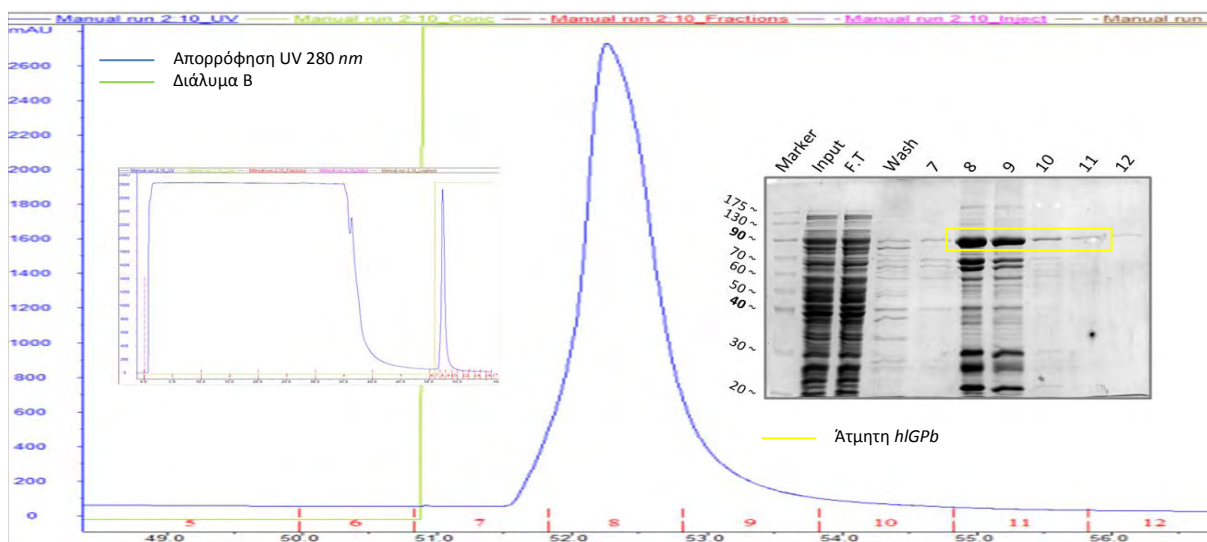
Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν

0.86 g <i>rmGPb</i> ανά kg σκελετικών μυών κονίκλων.
--

3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της *hlGP*

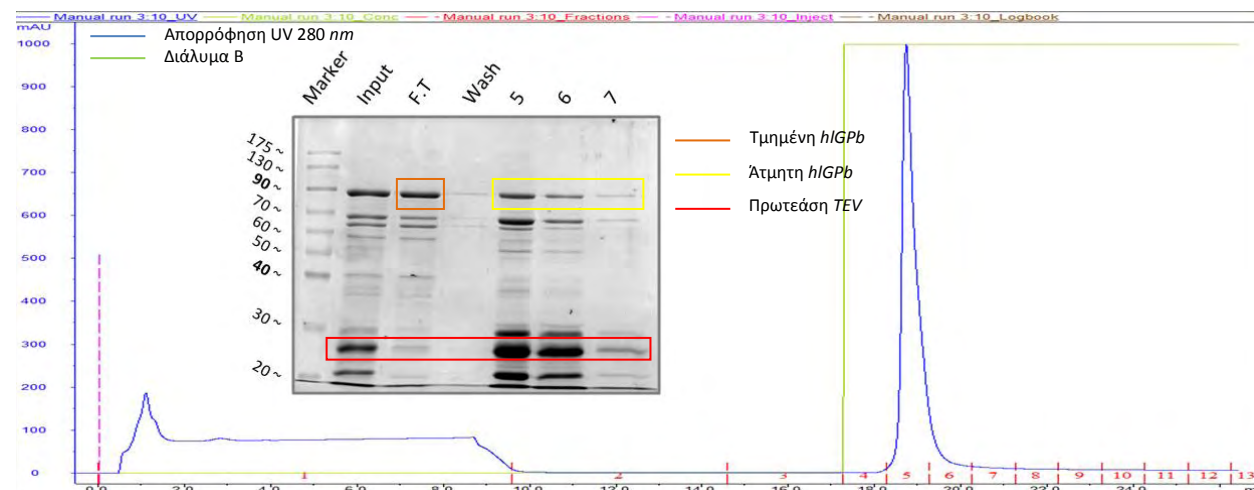
Το πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της *hlGPb* βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εμφανίζει συγγένεια με τα Ni^{2+} , λόγω των 6 ιστοιδινών που διαθέτει στο αμινοτελικό της άκρο. Το διάλυμα λύσης άλλα και το διάλυμα *A* με το οποίο έγινε εξισορρόπηση της στήλης, περιείχαν χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, 20 mM, η οποία δεν επαρκούσε ώστε το ιμιδαζόλιο να μην επιτρέψει στην πρωτεΐνη να συνδεθεί, άλλα απέτρεπε, σε ένα βαθμό, την μη

ειδική σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Αντίθετα το διάλυμα *B* περιείχε 0.5 *M* ιμιδαζολίου, ώστε να απομακρυνθούν οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Στην Εικόνα 33, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από SDS PAGE πυκνότητας 10 %



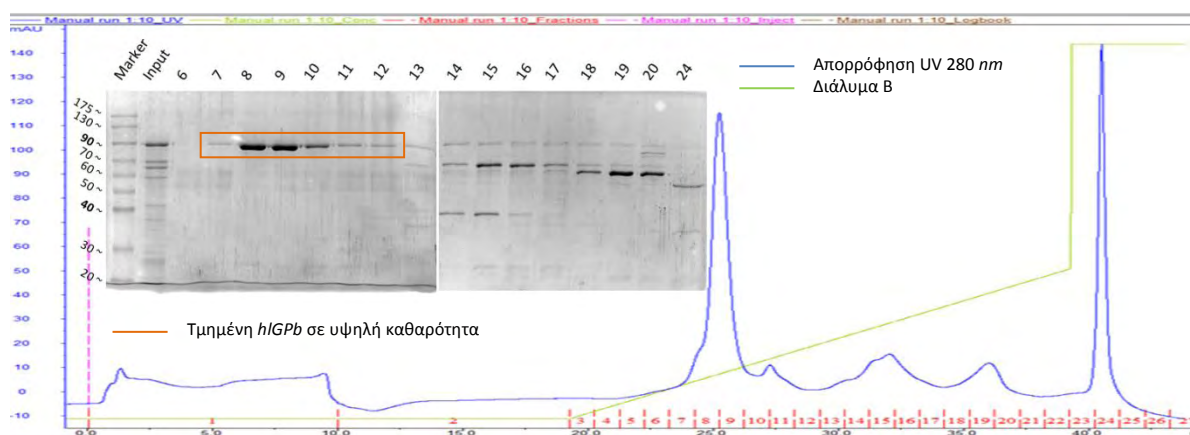
Εικόνα 33: Πρώτο βήμα καθαρισμού της *hIGP* (*His-Trap*). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*Flow Through*, κλάσματα 1-4), διαδρομή 4: πλύση της στήλης (*Wash*, κλάσμα 5), διαδρομές 5-10 έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 7-12).

Το δεύτερο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της *hIGPb* βασίστηκε στο γεγονός ότι η άτμητη πρωτεΐνη εξακολουθούσε να εμφανίζει συγγένεια με τα Ni^{2+} ενώ τη τμημένη δεν συνδέθηκε στη στήλη, μετά από πέψη με την πρωτεάση *TEV*. Επιπλέον, επετεύχθη διαχωρισμός από την πρωτεάση *TEV* (27 *KDa*) η οποία διέθετε ετικέτα ιστιδινών και προσδέθηκε στη στήλη μαζί με την άτμητη *hIGPb*.



Εικόνα 34: Δεύτερο βήμα καθαρισμού της *hIGP* μετά την τήση της ετικέτας συγγενείας από την πρωτεάση *TEV* (*His-Trap*): Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*Flow Through*, κλάσμα 1), διαδρομή 4: πλύση της στήλης (κλάσμα 2), διαδρομές 5-7 έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών (κλάσματα 5-7).

Στην *Εικόνα 34* παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες που εφαρμόστηκε στα κλάσματα της χρωματογραφίας. Παρατηρούμε πως στο *flow through* υπάρχει *hlGP*, το οποίο σημαίνει ότι η *TEV* απομάκρυνε την ετικέτα συγγένειας. Επίσης, παρατηρούμε ότι συγκριτικά με το *input* και το *flow through* δεν είναι μεγάλη η ποσότητα της πρωτεΐνης που έμεινε άτμητη, αν αναλογιστούμε ότι τα δυο αυτά δείγματα είχαν όγκο 5 mL, ενώ τα κλάσματα 5 και 6 στα οποία φαίνεται να έχει εκλουστεί η άτμητη *hlGP* είναι του 1 mL (συνολικά 2 mL). Επομένως, η απόδοση της πρωτεάσης *TEV* είναι ικανοποιητική. Τέλος, η πρωτεάση *TEV* προσδέθηκε στη στήλη και απομακρύνθηκε κατά την έκλουση.



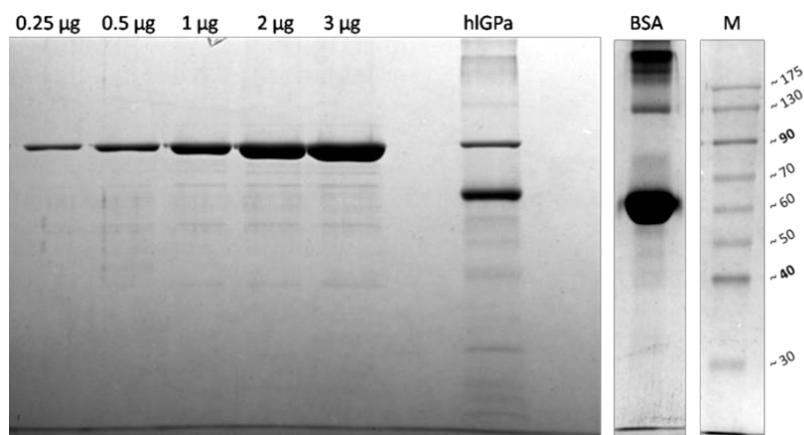
Εικόνα 35: Τρίτο βήμα καθαρισμού της *hlGP* με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (*Resource Q*). Η πρωτεΐνη εκλύεται με διαβάθμιση του διαλύματος B. Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα καθώς και τα αποτελέσματα από 10 % *SDS-PAGE*. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (κλάσμα 6), διαδρομές 4-19 έκλουση των προσδεσμένων πρωτεϊνών στη στήλη με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος B 0-40 % (κλάσματα 7-20) και στη διαδρομή 20 έκλουση με συγκέντρωση διαλύματος B 500 mM (κλάσμα 24).

Το τρίτο στάδιο απομόνωσης και καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η *hlGP* προσδένεται στη στήλη λόγω του αρνητικού φορτίου της σε *pH* 7.5 και στη συνέχεια εκλύεται με διαβάθμιση του παράγοντα ελκούσης, διότι αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Η έκλουση της *hlGPb*, όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα στην *Εικόνα 35* έγινε στο 12-16 % διαλύματος B, δηλαδή σε 120 έως 160 mM *NaCl* σε υψηλή καθαρότητα. Η συγκέντρωση της *hlGPa* μετά τη συμπύκνωση ήταν 0.16 mg/mL.

Η συνολική απόδοση της διαδικασίας ήταν 0.05 mg ανά L καλλιέργειας

3.1.3 Ποσοτικοποίηση της *hlGPa*

Η ποσοτικοποίηση της *hlGPa*, μετά το τέλος της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης και της συμπύκνωσης της πρωτεΐνης έγινε με πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10 %, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 36*, καθώς χρησιμοποιήσαμε την *rmGPb* ως μαρτύρα για την οποία μπορούσαμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τη συγκέντρωσή της, όπως αναφέρεται στο *εδαφίο 2.14*.



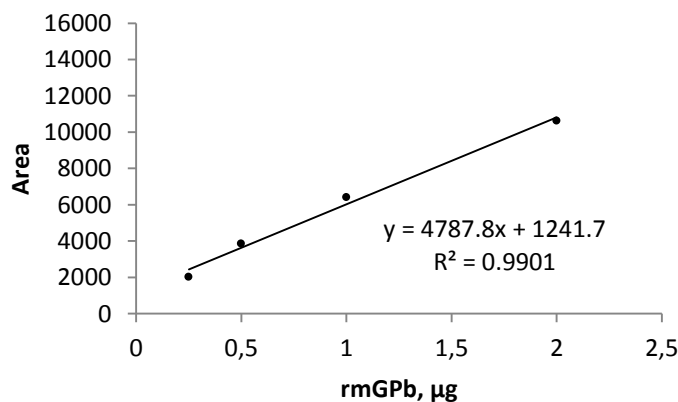
Εικόνα 36: 10 % SDS-PAGE για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας της *hIGPa*, μετά τη φωσφορυλίωση, με τη βοήθεια συγκριμένων ποσοτήτων της *rmGPb*. Διαδρομή 1: 0.25 µg *rmGPb*, διαδρομή 2: 0.5 µg *rmGPb*, διαδρομή 3: 1 µg *rmGPb*, διαδρομή 4: 2 µg *rmGPb*, διαδρομή 5: 3 µg *rmGPb*, διαδρομή 7: 3 µL *hIGPa*. Παρουσιάζεται επίσης ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών καθώς και η BSA η οποία φαίνεται πως προσδίδει επιπλέον προσμίξεις στο δείγμα μας.

Η ανάλυση της πηκτής με το λογισμικό *Image J* [114] μας έδωσε τα παρακάτω εμβαδά για κάθε ζώνη, όπως φαίνεται στον Πινάκα 4.

Πινάκα 4: Ανάλυση των ζωνών για παραγωγή καμπύλης ποσοτικοποίησης

Ποσότητες	Εμβαδά
0.25 µg <i>rmGPb</i>	2022
0.5 µg <i>rmGPb</i>	3866
1 µg <i>rmGPb</i>	6413
2 µg <i>rmGPb</i>	10620
3 µg <i>rmGPb</i>	13343
X µg <i>hIGPa</i>	2380

Τα παραπάνω δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή καμπύλης ποσοτικοποίησης τύπου $y = ax + b$, όπως φαίνεται στην Εικόνα 37. Τα δεδομένα για τα 3 µg *rmGPb* δεν χρησιμοποιήθηκαν διότι το αποτέλεσμα μείωνε την ποιότητα της καμπύλης. Η εξίσωση της καμπύλης που προέκυψε ήταν: $y = 4787.8x + 1241.7$



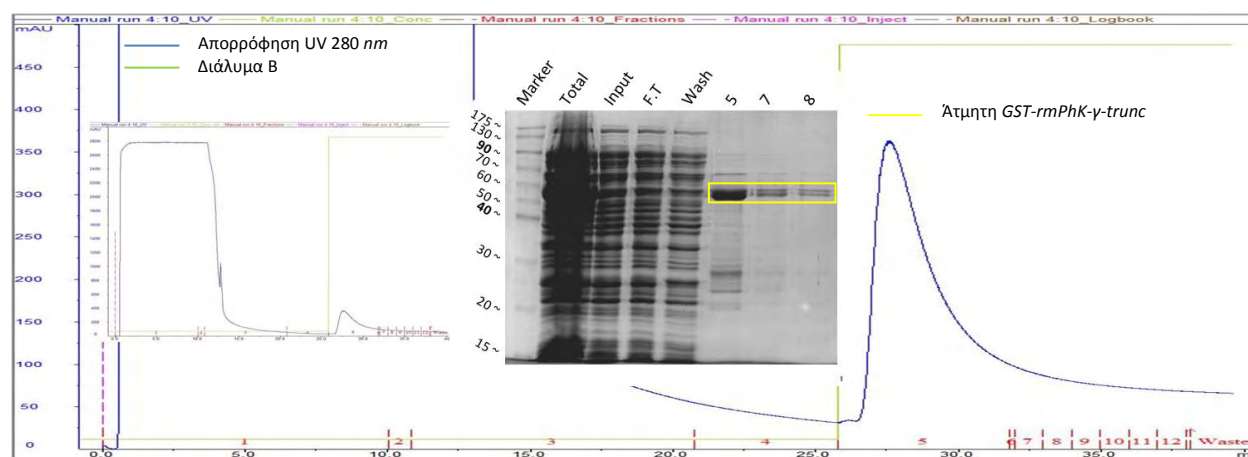
Εικόνα 37: Καμπύλη ποσοτικοποίησης με SDS-PAGE

Εφαρμόζοντας στην εξίσωση το εμβαδόν που προέκυψε για το δείγμα της *hlGP* υπολογίσαμε πως η ποσότητα της *hlGP* που εφαρμόσαμε στη πηκτή αντιστοιχούσε σε 0.24 μg στα 3 μl που εφαρμόσαμε από τα συνολικά 400 μl πρωτεΐνης που είχαμε. Επομένως, στα 400 μl πρωτεΐνης είχαμε 0.032 mg (από 4 L υγρής καλλιέργειας) συγκέντρωσης 0.080 mg/mL . Η απόδοση της απομονωμένης, καθαρής και φωσφοριωμένης *hlGPa* ήταν

8 μg *hlGPa* ανά L καλλιέργειας.

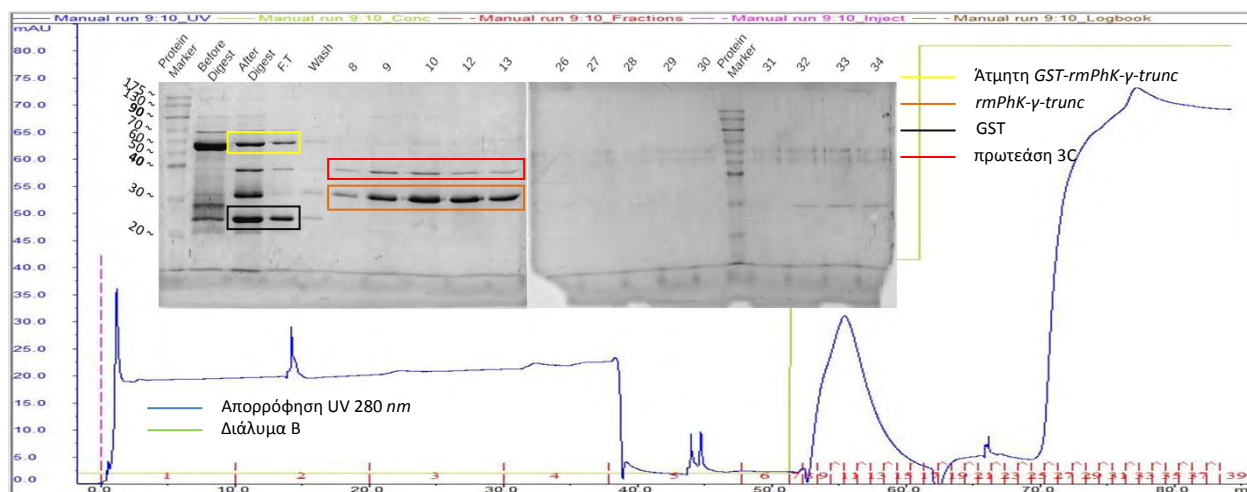
3.1.4 Καθαρισμός και απομόνωση της *rmPhK-γ-trunc*

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση της γ καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης εφαρμόστηκε αρχικά υγρή χρωματογραφία συγγένειας με στήλη που έχει προσροφημένη γλουταθειόνη, με την οποία εμφανίζει συγγένεια η *rmPhK-γ-trunc* μιας και διαθέτει ετικέτα συγγένειας *GST*. Στην *Εικόνα 38*, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από το *SDS PAGE* πυκνότητας 12 %, στο οποίο αναλύθηκαν τα κλάσματα της χρωματογραφίας. Στη διαδρομή 2 είναι το δείγμα που λάβαμε μετά τη λύση με υπερήχων και πριν τη φυγοκέντρωση (*Total*) στο οποίο παρατηρείται η υπερέκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η πηκτή έδειξε ότι η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσματα 5,7 και 8 και ακολούθησε τμήση της ετικέτας συγγένειας με την πρωτεάση 3C



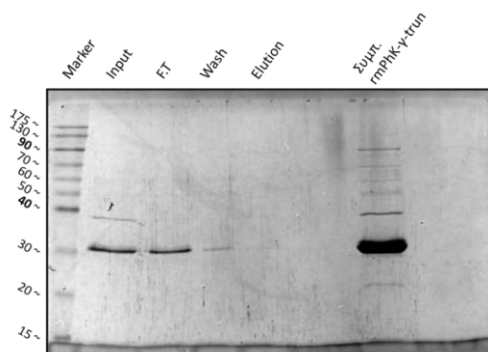
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα και αποτελέσματα από 12 % *SDS-PAGE*, από το πρώτο βήμα καθαρισμού της *rmPhK-γ-trunc*. Διαδρομή ένα: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: δείγμα μετά την λύση των βακτηρίων και πριν τη φυγοκέντρωση (*Total*), διαδρομή 3: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 4: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*flow through*, κλάσματα 1,2), διαδρομή 5: πλύση της στήλης (*Wash*, κλάσμα 4), διαδρομές 6-8: έκλυση των πρωτεϊνών από τη στήλη (κλάσματα 5-8)

Με την επώαση της πρωτεΐνης με την πρωτεάση 3C έγινε τμήση της ετικέτας συγγένειας *GST*, αλλά ήταν αναμενόμενο να υπάρχει και μια μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στην οποία δεν είχε επιτευχθεί η τμήση. Η εφαρμογή του δείγματος αυτού σε στήλη *Hi-Trap Cibacron blue* οδήγησε στο χρωματογράφημα που φαίνεται στην *Εικόνα 39*. Στην ίδια εικόνα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα από το *SDS-PAGE*, στο οποίο αναλύθηκαν τα κλάσματα της χρωματογραφίας. Στη διαδρομή 3 είναι το δείγμα που εφαρμόσαμε στη στήλη, δηλαδή το δείγμα στο οποίο έχει επιτευχθεί τμήση της ετικέτας συγγένειας και οδήγησε στην παραγωγή της *rmPhK-γ-trunc*, της *GST* και κάποιας ποσότητας *GST-rmPhK-γ-trunc*.



Εικόνα 39: Χρωματογράφημα και αποτελέσματα από 12 % SDS-PAGE, από το δεύτερο βήμα καθαρισμού της *rmPhK-γ-trunc*. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: πρώτο βήμα καθαρισμού πριν την προσθήκη της πρωτεάσης 3C, διαδρομή 3: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 4: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*flow through*, κλάσματα 1-4), διαδρομή 5: πλύση της στήλης (*Wash*, κλάσματα 5 και 6), διαδρομές 6-10 (κλάσματα 8-13) και 11-20 (κλάσματα 26-34) έκλυση πρωτεϊνών με 50 % (κλάσματα 7-17 στο χρωματογράφημα) και 100 % (κλάσματα 18-34 στο χρωματογράφημα) διαλύματος B αντίστοιχα, διαδρομή 16: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών.

Παρατηρούμε ότι η *GST* και η *GST-rmPhK-γ-trunc* δεν προσδέθηκαν στη στήλη ενώ η *rmPhK-γ-trunc* και η πρωτεάση 3C εμφανίζονται στα κλάσμα της έκλυσης 8-13. Τέλος, για τον διαχωρισμό της *rmPhK-γ-trunc* από την πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα συγγένειας *GST*, έγινε εφαρμογή υγρής χρωματογραφία με σφαιρίδια αгарόζης που είχαν ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Τα αποτελέσματα από την SDS-PAGE ανάλυση παρουσιάζονται στην **Εικόνα 40**. Παρατηρούμε πως η *rmPhK-γ-trunc* δεν προσδέθηκε στη στήλη, ενώ η πρωτεάση 3C συγκρατήθηκε στη στήλη και δεν απομακρύνθηκε στο *flow through* (*F.T*). Στη διαδρομή 6 βρίσκεται η συμπεκνωμένη κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία έχει ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας.



Εικόνα 40: Χρωματογράφημα και αποτελέσματα από 12 % SDS-PAGE, από το τρίτο βήμα καθαρισμού της *rmPhK-γ-trunc*. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*flow through*), διαδρομή 4: πλύση της στήλης (*wash*), διαδρομή 5: έκλυση των πρωτεϊνών (*elution*), διαδρομή 7: τελικό προϊόν (συμπεκνωμένο)

Η συνολική απόδοση της διαδικασίας ήταν 0.036 mg ανά L καλλιέργειας.

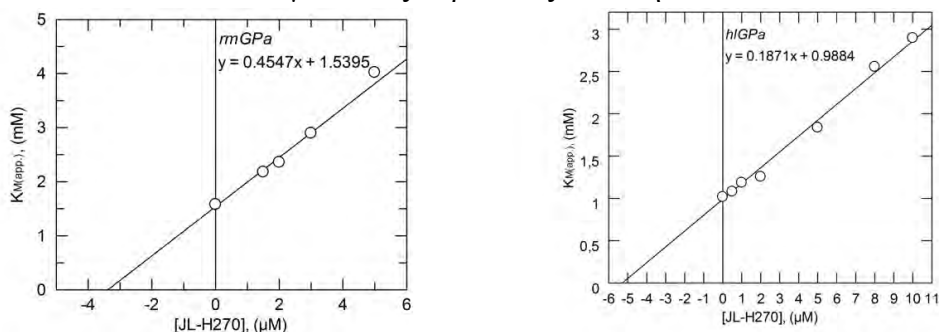
3.2 Κινητικές μελέτες

Ο έλεγχος της φωσφορυλίωσης της *rmGPb* από την *rmPhK-γ-trunc* ελέγχθηκε όπως αναφέρθηκε στο **εδάφιο 2.14**. Η επί τοις εκατό διαφορά στις δραστηριότητες σε 20 mM GIP παρουσία

και απουσία 1 mM AMP ήταν 15 %, κάτι το οποίο δηλώνει ότι η μετατροπή της b σε a έγινε με επιτυχία.

3.2.1 Προσδιορισμός της K_i του *JL H270*

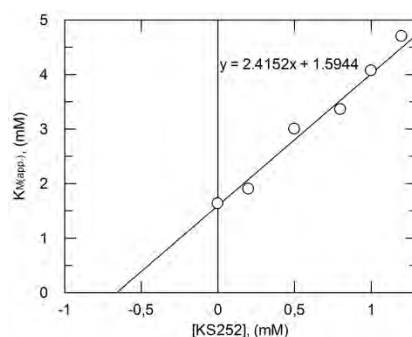
Οι K_i για τον αναστολέα *JL H270* υπολογίστηκαν έναντι της *rmGPa* στα $3.39 \pm 0.23 \mu\text{M}$, ενώ έναντι της *hlGPa* στα $5.28 \pm 0.23 \mu\text{M}$ όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 41*.



Εικόνα 41: Παρουσιάζονται τα διαγράμματα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα *JL H270* ως προς την *rmGPa* και την *hlGPa*. Στο ένθετο των διαγραμμάτων αναγράφονται οι εξισώσεις των ευθειών που προέκυψαν.

3.2.2 Προσδιορισμός της K_i του *KS252*

Η K_i για τον αναστολέα *KS252* έναντι της *rmGPa* υπολογίστηκε στα $660 \pm 5.5 \mu\text{M}$ όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 42*.



Εικόνα 42: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα *KS252* ως προς την *rmGPa*. Στο ένθετο του διαγράμματος αναγράφεται η εξίσωση της ευθείας

3.3 Κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα

Κρύσταλλοι της *rmGPb* άρχισαν να αναπτύσσονται μετά από 2 μέρες και απέκτησαν τη τελική τους μορφή μετά από τουλάχιστον ένα μήνα. Στην *Εικόνα 43*, φαίνονται διάφοροι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης. Οι κρύσταλλοι χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων-X ώστε να ταχτοποιηθεί η πρόσδεση των υπό μελέτη αναστολέων στην *rmGPb*.



Εικόνα 43: Κρύσταλλοι της *rmGPb* κάτω από στερεοσκόπιο

Στον *Πίνακα 5* αναγράφονται τα στοιχεία συλλογής των κρυσταλλογραφικών δεδομένων του

συμπλόκου *rmGPb* με τους αναστολείς. και στον Πίνακα 6 οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία των τελικών μοντέλων.

Πίνακας 5: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου *GPb*- αναστολέων

Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτισμένοι με διάλυμα 10 mM αναστολέα για 4h	
	KS252	JLH270
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας MaxLab, Lund, Σουηδία	ID911-2	
Μήκος κύματος, λ (Å)	1.0402	
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8	
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	70	50
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 ₃ 2 ₁ 2	
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	128.5, 128.5, 116.2	128.7, 128.7 116.2
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1	
Ευκρίνεια (Å)	38.73 - 1.90	38.40 - 1.85
Αριθμός περιθλάσεων	353099	271775
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	74613 (10693)	80695 (11707)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.069 (0.481)	0.063 (0.430)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	97.7 (97.1)	97.3 (97.4)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.00 - 1.90	1.95 - 1.85
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	13.6 (3.4)	11.2 (2.8)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	4.7 (4.8)	3.4 (3.3)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	23.2	23.0

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |I_{ih} - \langle I_{ih} \rangle| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου $\langle I_{ih} \rangle$ 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.

**σ(I) είναι η τυπική απόκλιση του I.

Πίνακας 6: Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-αναστολέων

	KS252	JLH270
Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	1.90	1.85
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	70859 (3734)	76693 (3962)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	12-254, 262-314, 324-836	12-254, 262-314, 324-836
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6607	6587
Αριθμός μορίων ύδατος	292	304
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	72	52
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R_{free})* (%)	17.2 (19.7)	16.7 (19.6)
R (R_{free}) (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	25.8 (28.3)	26.5 (26.7)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.009	0.010
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.3	1.3
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²)		
Πρωτεϊνικά άτομα	29.7	31.0
Ca, C, N, O	27.6	28.5
Πλευρική αλυσίδα	31.8	33.5
Ετεροάτομα	30.7	23.8
Μόρια ύδατος	35.5	37.0

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

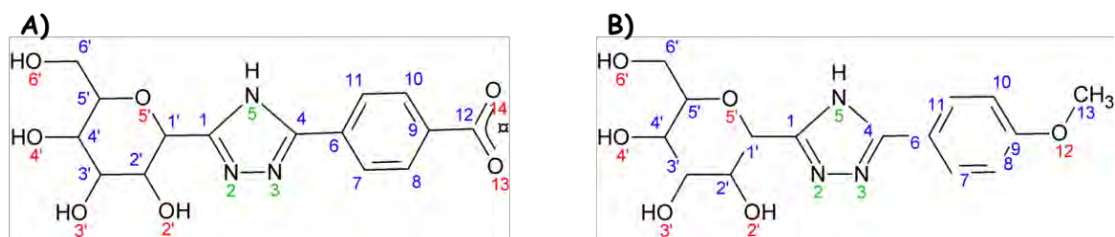
[#] Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμοποιείται για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Στον Πίνακα 7 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο της *rmGPb*. Η αρίθμηση των χημικών δομών παρουσιάζεται στην Εικόνα 44. Στην Εικόνα 45 και Εικόνα 46 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν οι αναστολείς κατά την πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο με τα μόρια ύδατος να δημιουργούν ένα έμμεσο δίκτυο σύνδεσης των μορίων των αναστολέων με γειτονικά αμινοξέα του κέντρου σχηματίζοντας γέφυρες ύδατος (*water bridges*). Παρουσιάζονται επίσης και οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, για

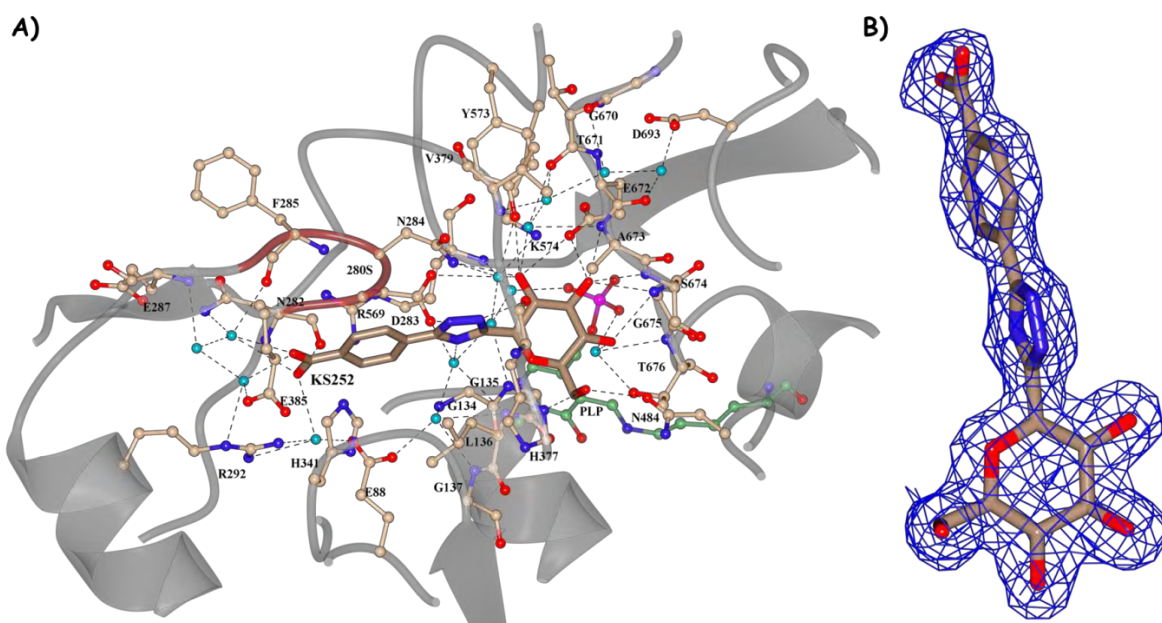
τα μόρια των αναστολέων μετά την βελτιστοποίηση.

Πίνακας 7: Συγκεντρικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της *rmGPb* μεταξύ των αναστολέων *KS252* και *JL H270* και των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

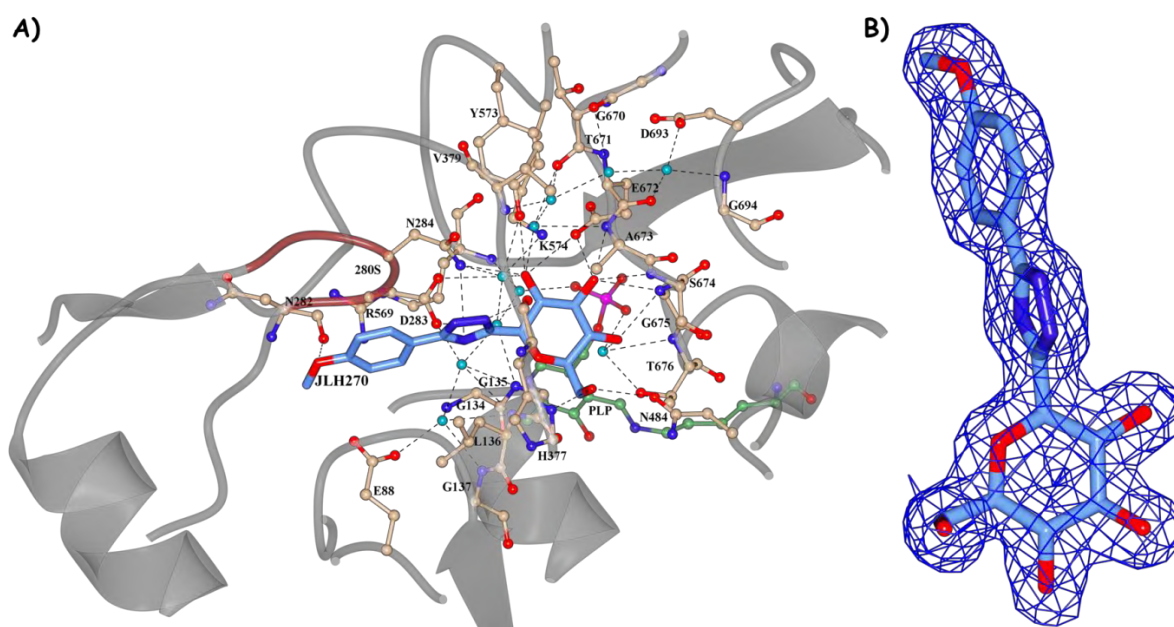
Inhibitor atom	Protein residues (atoms)			
	Hydrogen bonds (-3.35 Å)		Van der Waals interactions (-4.0 Å)	
	KS252	JL H270	KS252	JL H270
C11			Asn284(N), Water257(O)	Asn284(N), Water273(O)
C10			Glu88(OE1), Asn282(O), Asn284(N), Water195(O)	Glu88(OE1), Asn282(O), Asn284(N)
C9			Asn282(O), Asn284(N), His341(CE1,NE2)	Asn282(O), Asn284(N), His341(CE1)
C13	-		-	Glu88(OE1), Asn282(O), Arg292(NH2), Water288(O), Water198(O), Water184(O)
O12	-	Asn282(O):3.3	-	Phe285(O), Water198(O), Water184(O)
C12		-	Asn282(O), His341(NE2), Phe285(O), Water195(O), Water182(O)	-
O13	Water182(O):3.3, Water95(O):3.1	-	His341(NE2), Arg292(NH2), Phe285(O)	-
O14	Asn282(O):3.2, Water195(O):2.9, Water182(O):3.3	-	Arg292(NH2)	-
C8			Asn284(N), His341(CE1,NE2), Water271(O)	Asn284(N), His341(CE1,NE2), Water281(O)
C7			Asn284(N,CA), Water271(O)	Asn284(N,CA), Water281(O)
C6			Asn284(N,CA)	Asn284(N,CA)
C4			Asn284(ND2,CG), Water257(O)	Leu136(CD1), Asn284(ND2,CG), Water273(O)
N5	Water257(O):2.8	Asn284(ND2):3.3, Water273(O):2.8	Leu136(CB), Asn284(ND2)	Leu136(CB)
N3			His377(CB,O), Asn284(ND2,CG,OD1), Thr378(CB,CG2)	His377(CB,O), Asn284(ND2,CG,OD1), Thr378(CB,CG2)
N2	His377(O):2.8	His377(O):2.7	Asn284(ND2,OD1), His377(CB,C), Thr378(CB)	Asn284(ND2,OD1), His377(CB,C), Thr378(CB)
C1			Asn284(ND2), His377(CB,O), Water257(O)	Asn284(ND2), His377(O), Water273(O)
C1'			Water274(O), Water257(O)	Asn284(ND2), Water273(O), Water280(O)
O5'			His377(ND1,CB), Leu136(CA,CB,N)	His377(ND1,CB), Leu136(CA,CB,N)
C5'			Gly135(C), Leu136(N), Water261(O)	Gly135(C), Leu136(N), Water119(O)
C6'			Gly135(C,O), His377(ND1), Asn484(OD1), Leu136(CA,N)	Gly135(O,C), His377(ND1), Asn484(OD1), Leu136(CA)
O6'	Asn484(OD1):2.7, His377(ND1):2.7	Asn484(OD1):2.8, His377(ND1):2.7	Leu139(CD2), Val455(CG2,CB,CG1), His377(CE1,CG), Asn484(CG)	Val455(CG2,CG1), Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Asn484(CG)
C4'			Gly675(N), Water261(O)	Gly675(N), Water119(O)
O4'	Gly675(N):2.9, Water261(O):2.6	Gly675(N):2.8, Water119(O):2.6	Gly675(CA,C,O), Ser674(CB,C), Asn484(OD1)	Gly675(C,O,CA), Thr676(N), Ser674(CB,C), Asn484(OD1)
C3'			Gly675(N), Glu672(OE1), Water261(O)	Gly675(N), Glu672(OE1), Water119(O)
O3'	Ser674(N):3.0, Glu675(N):3.1, Glu672(OE1):2.8, Ala673(N):3.3	Ser674(N):3.0, Gly675(N):3.1, Glu672(OE1):2.7, Ala673(N):3.2	Gly675(CA), Ala673(CA,C,CB), Ser674(CA,C), Glu672(CG,CD,C), Water260(O)	Ala673(C,CA,CB), Ser674(CA,C), Glu672(CG,CD,C), Water269(O)
C2'			Glu672(OE1), His377(O), Water274(O), Water260(O)	Glu672(OE1), Asn284(ND2), His377(O), Water280(O), Water269(O)
O2'	Tyr573(OH):3.0, Glu672(OE1):3.1, Asn284(ND2):2.9, Water274(O):2.7, Water260(O):2.9	Tyr573(OH):3.0, Glu672(OE1):3.1, Asn284(ND2):2.9, Water280(O):2.8, Water269(O):2.9	Asn284(CG)	Asn284(CG,OD1)
Total	20	17	98	96



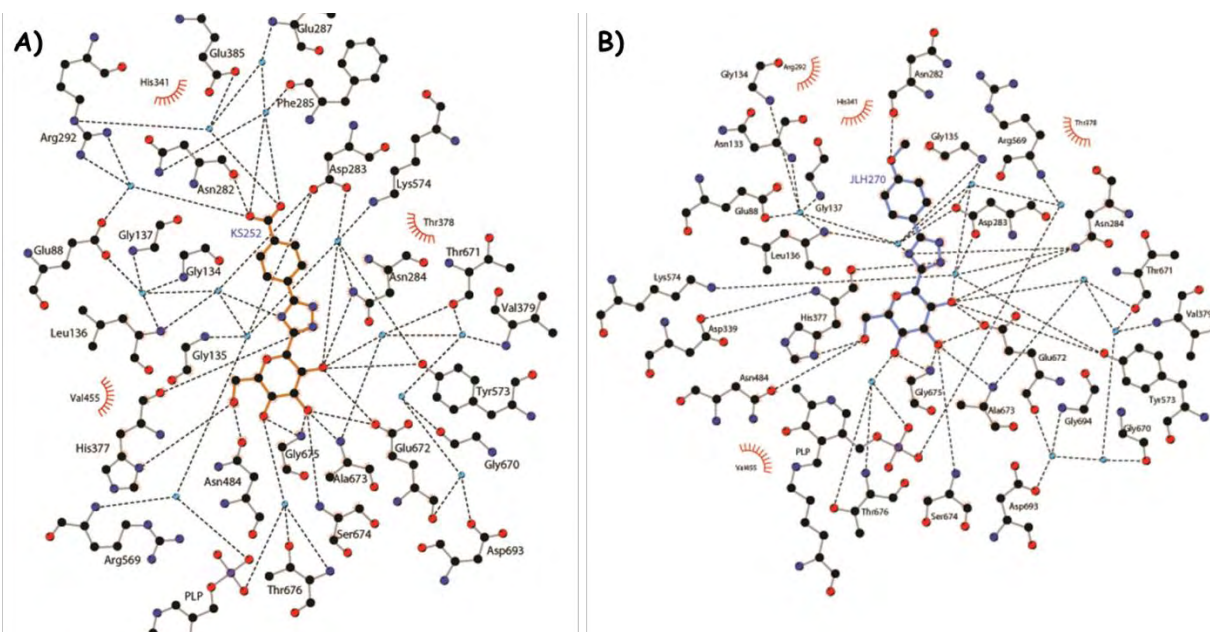
Εικόνα 44: Σχηματικό διάγραμμα των χημικών δομών των αναστολέων που μελετήθηκαν. A) *KS252*, B) *JL H270*



Εικόνα 45: A) Πρόσδεση του *KS252* στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια ύδατος με κυανό χρώμα. B) Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{obs}-F_{calc}$ σε 1σ

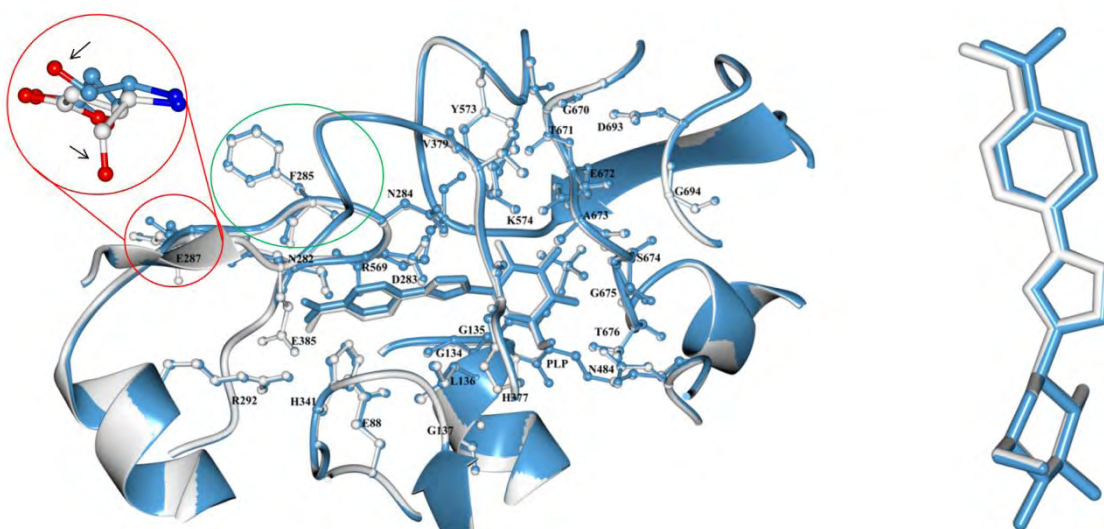


Εικόνα 46: A) Πρόσδεση του *JL H270* στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια ύδατος με κυανό χρώμα. B) Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{obs}-F_{calc}$ σε 1σ .



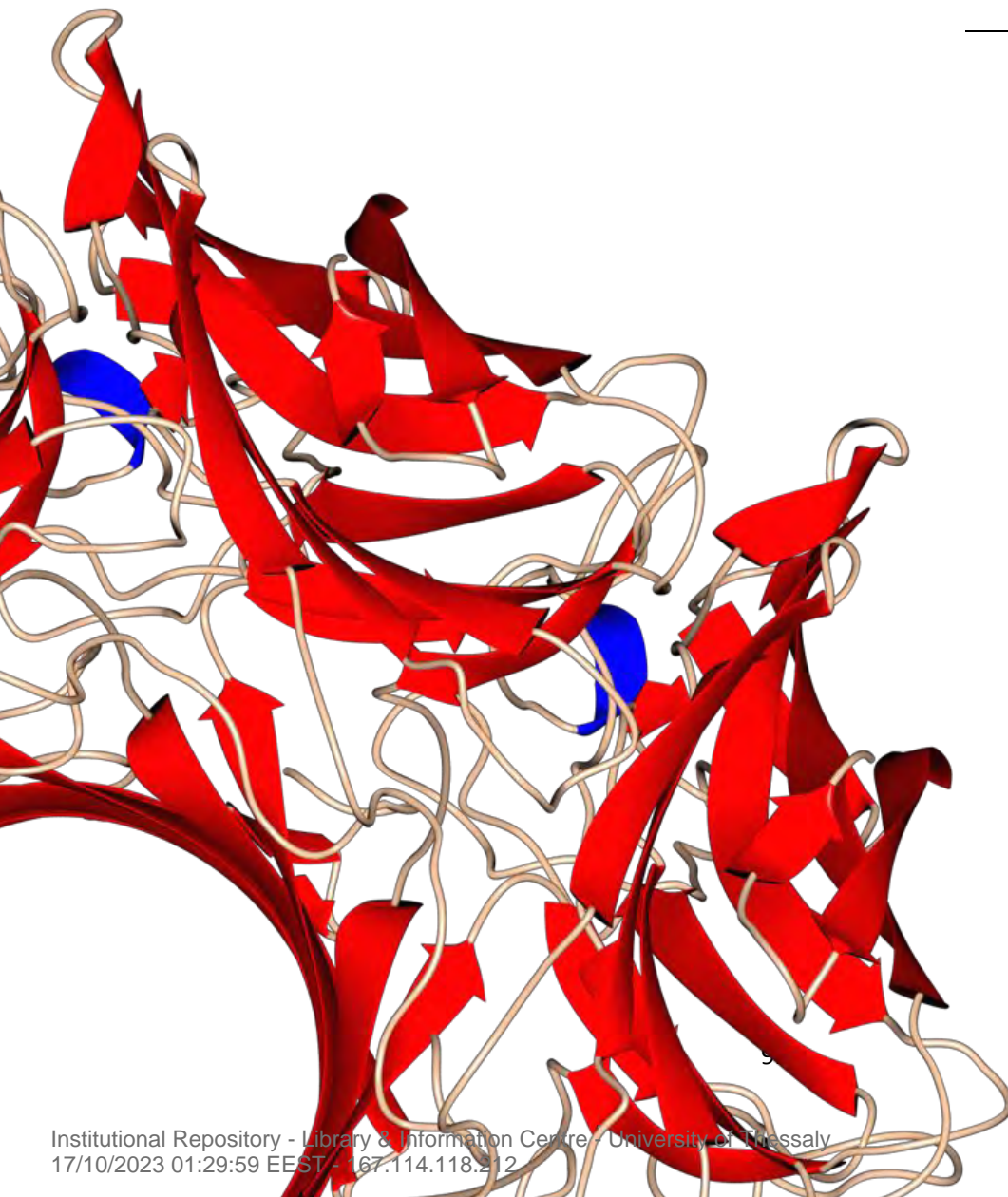
Εικόνα 47: Σχηματικό διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται από την πρόσδεση των αναστολέων **A)** KS252 και **B)** JLH270 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου [115].

Στην *Εικόνα 47* παρουσιάζεται ένα σχηματικό διάγραμμα δύο διαστάσεων της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων των αναστολέα μετά τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου με το πρόγραμμα *LigPlot* [115]. Προκειμένου να προσδιορίσουμε την αιτία που οι δύο αυτοί αναστολείς παρουσιάζουν τέτοια μεγάλη διαφορά ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την *GP*, πραγματοποιήσαμε υπέρθεση των δύο δομών όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 48*. Η υπέρθεση αυτή έγινε συγκρίνοντας την δευτεροταγή δομή των δύο δομών (*Secondary Structure Matching, SSM*) για όλη την αλληλουχία της πρωτεΐνης (*Εικόνα 48*). Για απλούστευση της εικόνας δεν παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσουν οι δύο αναστολείς με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα.



Εικόνα 48: Δομική σύγκριση των συμπλοκών *JLH270-rmGPb* (λευκό) και *KS252-rmGPb* (μπλε), και της χωροθέτησης των *JLH270* (λευκό) και *KS252* (μπλε) που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

4. Συζήτηση

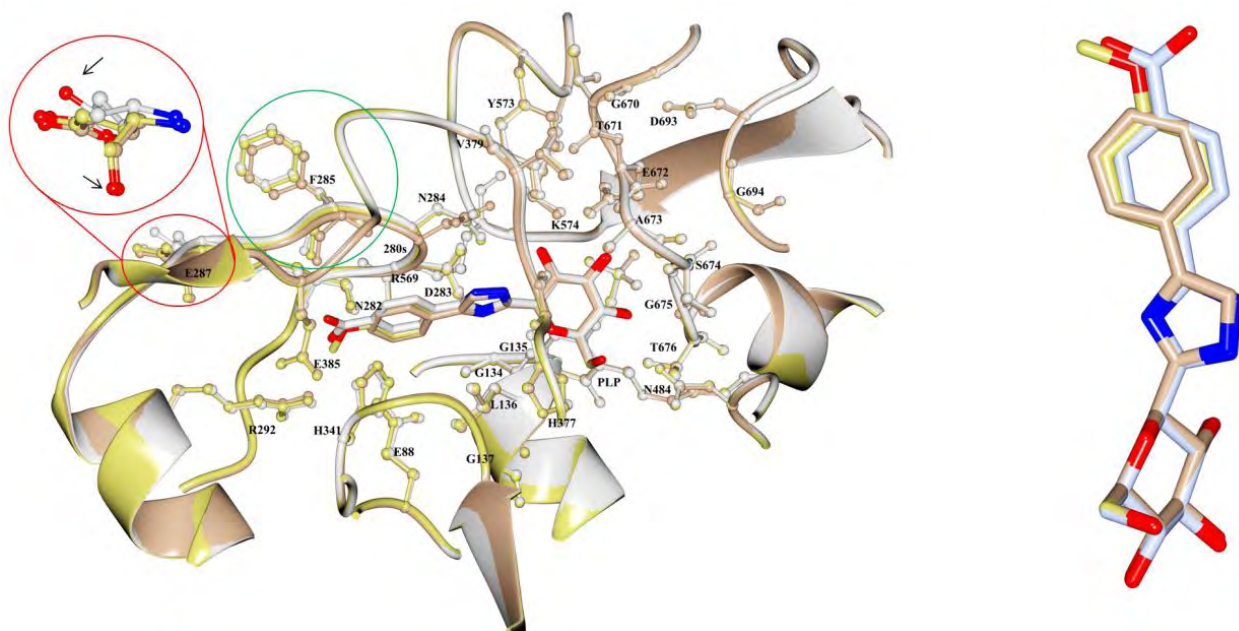


Η 3D δομή της αιμολυσίνης α του σταφυλόκοκκου, που αποτελείται από έναν επταμερή διαμεμβρανικό πόρο, PDB-ID: 7AHL

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΣΔ2 αποτελεί μία μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει την υγεία εκατομμυρίων ανθρώπων. Το 2035 αναμένεται να νοσούν από ΣΔ2 592 εκατομμύρια άνθρωποι [9] αν δεν βρεθεί μια πιο αποτελεσματική φαρμακευτική προσέγγιση. Τα φάρμακα που χορηγούνται σήμερα, στοχεύουν κυρίως στη βέλτιστη αξιοποίηση της γλυκόζης από τα κύτταρα [24]. Είναι επομένως επιτακτική ανάγκη η ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η *GP* καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (*GIP*). Η *GIP* μετατρέπεται στα ηπατοκύτταρα σε ελεύθερη γλυκόζη ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Στους διαβητικούς ασθενείς η γλυκογονόλυση εξασκοιουθεί να αποτελεί μια σημαντική πηγή παραγωγής γλυκόζης παρότι τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένα. Επομένως, η *GP* αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων αντί-υπεργλυκαιμικών ενώσεων για τη θεραπεία του ΣΔ2 [1-3]. Η *GP* υπάρχει σε αλληλομετατροπούμενες μορφές, την *GPb*, που έχει χαμηλή δραστηριότητα και χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα (*T*-στερεοδιαμόρφωση), και την *GPa* η οποία έχει υψηλή δραστηριότητα και υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα (*R*-στερεοδιαμόρφωση) [4]. Η μετατροπή της *b* σε *a* γίνεται με φωσφορυλίωση στη *Ser14* της *GPb* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [5]. Η *GP* διαθέτει 6 γνωστές θέσεις σύνδεσης προσδετών και το καταλυτικό της κέντρο βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών μελετών. Η πλειοψηφία τους εστιάζεται σε ανάλογα γλυκόζης που σχεδιάστηκαν με βάση την αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου, με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών, ώστε να αυξηθούν οι ειδικές αλληλεπιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο [6]. Στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η ανακάλυψη ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν). Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu M$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [116]. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την επίδραση C-β-D γλυκοκυρανόζυλο-τριαζολίων (*KS252* και *JL H270*) που διαθέτουν μια ομάδα φαινυλίου με διαφορετικούς υποκαταστάτες, ως προς τη δραστηριότητα της *GP*. Αρχικά έγινε απομόνωση της *GP* από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGP*) και των πρωτεϊνών: ανθρώπινη ηπατική *GP* (*hlGP*), γ-καταλυτική υπομονάδα της *PhK* (*PhK-γ-trunc*) από μετασχηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας *AKTA-FPLC*. Μελετήσαμε την επίδραση αυτών των αναστολέων στη δραστηριότητα της *rmGPa* και ο πλέον βιοδραστικός αναστολέας μελετήθηκε έναντι της ανασταλτικής του δράσης ως προς την *hlGPa*. Οι *rmGPa* και *hlGPa* προήλθαν με φωσφορυλίωση από την *rmPhK-γ-trunc*. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της *rmGPb* για κρυσταλλογραφικές μελέτες. Η περίθλαση ακτίνων X με συγχροτρονική ακτινοβολία οδήγησε στην ταυτοποίηση της πρόσδεσης των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο, καθώς και στην ανάδειξη των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούν με τα κατάλοιπα του κέντρου αυτού. Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τους *KS252* και *JL H270* έναντι της *rmGPa* ήταν $660 \pm 5.5 \mu M$ και $3.39 \pm 0.23 \mu M$, αντίστοιχα, ενώ η σταθερά αναστολής για τον *JL H270* έναντι της *hlGPa* ήταν $5.28 \pm 0.23 \mu M$. Μια πιο μακροσκοπική προσέγγιση, με υπέρθεση των δυο συμπλόκων όπως φαίνεται στην *Εικόνα 48* έδειξε ότι παρατηρείται μια διαφορά στη θέση πρόσδεσης του φαινυλικού δακτυλίου μεταξύ των δύο ανα-

στολέων καθώς και μια μικρή μετατόπιση του βρόχου 280s. Η μετατόπιση του βρόχου 280s σε κλειστή διαμόρφωση οδηγεί σε αναστολή της ενζυμική δραστηριότητας μιας και δεν επιτρέπει την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επίσης παρατηρείται και μια μετακίνηση της καρβοξυλομάδας του καταλοίπου *Glu282* κατά την πρόσδεση του *KS252*. Η μετακίνηση αυτή δηλώνει πως η πρόσδεση του αναστολέα *KS252* οδηγεί σε μια διαταραχή της αρχιτεκτονικής του καταλυτικού κέντρου η οποία έχει ενεργειακό κόστος το οποίο οδηγεί σε αύξηση της τιμής της K_i . Αν συγκρίνουμε τα παραπάνω γεγονότα με την ανάλυση των δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* του Πίνακα 7 παρατηρούμε ότι αναστολέας *JL H270* δημιουργεί έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *Asn284*, το οποίο είναι ένα από τα δομικά στοιχεία του βρόχου 280s, όπως αναλύεται στην *Εικόνα 45* και στην *Εικόνα 46*. Η ομάδα $-COOH$ του αναστολέα *KS252*, δημιουργεί επιπλέον δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου τα οποία όμως δεν συμμετέχουν στο βρόχο 280s. Έτσι λοιπόν ο *JL H270* φαίνεται να αναστέλλει αποτελεσματικότερα την *GP*, λόγω καλύτερης σταθεροποίησης του βρόχου 280s στην κλειστή του διαμόρφωση. Για την επιβεβαίωση των παρατηρήσεων αυτών πραγματοποιήσαμε μια ακόμα υπέρθεση των δομών των συμπλόκων με τους δύο αναστολείς στο σύμπλοκο του αναστολέα **8a**. Ο αναστολέας αυτός ανήκει στην κατηγορία των *C-β-D-γλυκοκυρανόζυλο* ιμιδαζολίων με μια ομάδα φαινυλίου και αναστέλλει την *GP* με μια σταθερά αναστολής K_i ίση με $0.226 \mu M$ έναντι της *rmGP* ($0.156 \mu M$ έναντι της *hlGP*) και προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου [39]. Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης φαίνονται στην *Εικόνα 49*. Παρατηρούμε ότι, όντως, η διαφορά στη θέση της ομάδας του φαινυλίου των αναστολέων συνδέεται με τη μετατόπιση του βρόχου 280s που σταθεροποιεί το ένζυμο στην *T*-στερεοδιαμόρφωση καθιστώντας το έτσι λιγότερο δραστικό.



Εικόνα 49: Υπέρθεση της δευτεροταγούς δομής των συμπλόκων των αναστολέων *KS252* (γαλάζιο), *JL H270* (κίτρινο), **8a** (καφέ) με την *rmGP*. Με κόκκινο επισημαίνεται η μετακίνηση της *Phe285* που ταυτίζεται με την μετατόπιση του βρόχου 280s

Μπορούμε να παρατηρήσουμε την μετακίνηση του βρόχου 280s παρατηρώντας απλά την μετατόπιση της *Phe285*. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η καρβοξυλομάδα του καταλοίπου *Glu282* έχει την ίδια διαμόρφωση κατά την πρόσδεση των **8a** και *JL H270*, ενώ διαφέρει κατά την πρόσδεση του *KS252*. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η διαφορά στις τιμές των σταθερών αναστολής μεταξύ των αναστολέων *KS252* και *JL H270*, οφείλεται σε μια μετακίνηση της φαινυλικής ομάδας του αναστολέα *JL H270* που έχει ως αποτέλεσμα μια καλύτερη σταθεροποίηση του βρόχου 280s στην κλειστή διαμόρφωση. Επιπλέον, η αλλαγή στη διαμόρφωση της καρβοξυλομάδας του καταλοίπου *Glu282* κατά την πρόσδεση του *KS252*, σχετίζεται με ένα ενεργειακό κόστος και επομένως με μια πιο υψηλή σταθερά αναστολής.

Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι οι αναστολείς *C-β-D* γλυκοκυρανόζυλο τριαζολίων, με αλλαγές στον υποκαταστάτη του βενζολίου, μπορεί να αποτελέσουν υποσχόμενους αναστολείς για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο αποτελεί η εύρεση μικρών ενώσεων που θα μπορούν να αναστέλλουν σημαντικά και άλλα ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως είναι η κινάση της φωσφορυλάσης και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου *in vitro* αλλά και *in vivo*.



5. Βιβλιογραφία

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3:561-86.
- [2] Rath VL, Ammirati M, Danley DE, Ekstrom JL, Gibbs EM, Hynes TR, et al. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem Biol* 2000;7:677-82.
- [3] Treadway JL, Mendys P, Hoover DJ. Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:439-54.
- [4] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [5] Owen DJ, Noble ME, Garman EF, Papageorgiou AC, Johnson LN. Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure* 1995;3:467-82.
- [6] Hayes JM, Leonidas DD. Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design. *Mini Rev Med Chem* 2010;10:1156-74.
- [7] Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21:587-605.
- [8] Laios K, Karamanou M, Saridaki Z, Androutsos G. Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes. *Hormones (Athens)* 2012;11:109-13.
- [9] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;103:137-49.
- [10] Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman AM, Baan C, Forouhi NG, et al. Diabetes in Europe: an update. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;103:206-17.
- [11] Gale JE, Cox HI, Qian J, Block GD, Colwell CS, Matveyenko AV. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *J Biol Rhythms* 2011;26:423-33.
- [12] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
- [13] Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S5-20.
- [14] Chiasson JL, Aris-Jilwan N, Belanger R, Bertrand S, Beauregard H, Ekoe JM, et al. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *CMAJ* 2003;168:859-66.
- [15] Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014;383:69-82.
- [16] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
- [17] Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15768-73.
- [18] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.

- [19] Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005;307:380-4.
- [20] Muzaffar M, Ahmad A. The mechanism of enhanced insulin amyloid fibril formation by NaCl is better explained by a conformational change model. *PLoS One* 2011;6:e27906.
- [21] Beckett GJ. Lecture notes. *Clinical biochemistry*. 7th ed. Malden, Mass., USA: Blackwell Pub.; 2005.
- [22] Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:873-91.
- [23] van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med* 2013;71:174-87.
- [24] Bailey CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 1992;15:755-72.
- [25] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998;336 (Pt 1):19-31.
- [26] Young FG. Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect. *Br Med J* 1957;1:1431-7.
- [27] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 2012;441:763-87.
- [28] Adeva-Andany MM, Gonzalez-Lucan M, Donapetry-Garcia C, Fernandez-Fernandez C, Ameneiros-Rodriguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin* 2016;5:85-100.
- [29] Chen M. *Molecular Pathology of Liver Diseases*: Springer; 2011.
- [30] Grant SK. Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1163-77.
- [31] Venien-Bryan C, Jonic S, Skamnaki V, Brown N, Bischler N, Oikonomakos NG, et al. The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. *Structure* 2009;17:117-27.
- [32] Begum J, Skamnaki VT, Moffatt C, Bischler N, Sarrou J, Skaltsounis AL, et al. An evaluation of indirubin analogues as phosphorylase kinase inhibitors. *J Mol Graph Model* 2015;61:231-42.
- [33] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:1089-98.
- [34] Cori CF, ; Cori, G. T.,. Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester. *Journal of Biological Chemistry* 1936;34:702-5.
- [35] Cori CF, ; Colowick, S. P.,; Cori, G. T.,. The isolation and synthesis of glucose-1-phosphoric acid. *Journal of Biological Chemistry* 1937;121:465-77.
- [36] Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1989;24:69-99.
- [37] Lillpopp L, Tzikas S, Ojeda F, Zeller T, Baldus S, Bickel C, et al. Prognostic information of glycogen phosphorylase isoenzyme BB in patients with suspected acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2012;110:1225-30.
- [38] Mathieu C, de la Sierra-Gallay IL, Duval R, Xu X, Cocaign A, Leger T, et al. Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *J Biol Chem* 2016;291:18072-83.

- [39] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al. Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase. *Eur J Med Chem* 2016;123:737-45.
- [40] Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich EJ. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 1990;29:1099-107.
- [41] Johnson LN, Hu SH, Barford D. Catalytic mechanism of glycogen phosphorylase. *Faraday Discuss* 1992:131-42.
- [42] Weaver TM. The pi-helix translates structure into function. *Protein Sci* 2000;9:201-6.
- [43] Barford D, Johnson LN. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 1989;340:609-16.
- [44] Oikonomakos NG, Zographos SE, Skamnaki VT, Archontis G. The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *Bioorg Med Chem* 2002;10:1313-9.
- [45] Sprang SR, Withers SG, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science* 1991;254:1367-71.
- [46] Martin JL, Johnson LN, Withers SG. Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b. *Biochemistry* 1990;29:10745-57.
- [47] Johnson LN, Acharya KR, Jordan MD, McLaughlin PJ. Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex. *J Mol Biol* 1990;211:645-61.
- [48] Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Oikonomakos NG. Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug. *Arch Biochem Biophys* 2000;384:245-54.
- [49] Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 2014;67:35-43.
- [50] Kyriakis E, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadou DS, Skamnaki VT, Leonidas DD. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. *FEBS Lett* 2015;589:1787-94.
- [51] Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci* 2003;12:1914-24.
- [52] Johnson LN, Snape P, Martin JL, Acharya KR, Barford D, Oikonomakos NG. Crystallographic binding studies on the allosteric inhibitor glucose-6-phosphate to T state glycogen phosphorylase b. *J Mol Biol* 1993;232:253-67.
- [53] Fletterick RJ, Sprang SR. Glycogen-Phosphorylase Structures and Function. *Accounts of Chemical Research* 1982;15:361-9.

- [54] Oikonomakos NG, Zographos SE, Tsitsanou KE, Johnson LN, Acharya KR. Activator anion binding site in pyridoxal phosphorylase b: The binding of phosphite, phosphate, and fluorophosphate in the crystal. *Protein Science* 1996;5:2416-28.
- [55] Leonidas DD, Oikonomakos NG, Papageorgiou AC. Sulphate activates phosphorylase b by binding to the Ser (P) site. *Biochim Biophys Acta* 1991;1076:305-7.
- [56] Johnson LN, Hajdu J, Acharya KR, Stuart DI, McLaughlin PJ, Oikonomakos NG, et al. Glycogen phosphorylase b. In: Herve G, editor. *Allosteric Enzymes*. Boca Raton, FL.: CRC Press; 1989. p. 81-127.
- [57] Johnson LN. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J* 1992;6:2274-82.
- [58] Martin JL, Veluraja K, Ross K, Johnson LN, Fleet GW, Ramsden NG, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes. *Biochemistry* 1991;30:10101-16.
- [59] Somsak L. Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase. *Comptes Rendus Chimie* 2011;14:211-23.
- [60] Somsak L, Nagya V, Hadady Z, Docsa T, Gergely P. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr Pharm Des* 2003;9:1177-89.
- [61] Oikonomakos NG, Somsak L. Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr Opin Investig Drugs* 2008;9:379-95.
- [62] Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13:471-98.
- [63] Papageorgiou AC, Oikonomakos NG, Leonidas DD. Inhibition of rabbit muscle glycogen phosphorylase by D-gluconohydroximo-1,5-lactone-N-phenylurethane. *Arch Biochem Biophys* 1989;272:376-85.
- [64] Oikonomakos NG, Schnier JB, Zographos SE, Skamnaki VT, Tsitsanou KE, Johnson LN. Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J Biol Chem* 2000;275:34566-73.
- [65] Oikonomakos NG, Skamnaki VT, Tsitsanou KE, Gavalas NG, Johnson LN. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 2000;8:575-84.
- [66] Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:52-7.
- [67] Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 1965;12:88-118.
- [68] Monod J, Changeux JP, Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 1963;6:306-29.
- [69] Κλώνης Ι. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007.

- [70] Agius L. Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2010;10:1175-87.
- [71] Jaskolski M, Dauter Z, Wlodawer A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. *FEBS J* 2014;281:3985-4009.
- [72] Thurrowgood D, Paterson D, de Jonge MD, Kirkham R, Thurrowgood S, Howard DL. A Hidden Portrait by Edgar Degas. *Sci Rep* 2016;6:29594.
- [73] Rieder R, Gellert R, Bruckner J, Klingelhofer G, Dreibus G, Yen A, et al. The new Athena alpha particle X-ray spectrometer for the Mars Exploration Rovers. *Journal of Geophysical Research-Planets* 2003;108.
- [74] Wasserman SR, Koss JW, Sojitra ST, Morisco LL, Burley SK. Rapid-access, high-throughput synchrotron crystallography for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:261-7.
- [75] Stallforth P, Clardy J. X-ray crystallography: One size fits most. *Nature* 2013;495:456-7.
- [76] Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8.
- [77] Rhodes G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006.
- [78] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
- [79] Καραϊσκάκης Γ. Φυσικοχημεία. Π Τραυλός 1998.
- [80] Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 2008;275:1-21.
- [81] Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 2011;50:8264-9.
- [82] Price NC, Stevens L. Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999.
- [83] Γεωργάτσος ΙΓ, ; Γιουσάνης, Τ.Α., ; Κυριακίδης, Δ.Α., . Ενζυμολογία: Ζήτη; 2001.
- [84] Lineweaver H. B, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, . JAmChem 1934.
- [85] Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170-1.
- [86] Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;83:791-8.
- [87] Ettre LS, Sakodyskii KI. Tswett,M.S. And the Discovery of Chromatography .1. Early Work (1899-1903). *Chromatographia* 1993;35:223-31.
- [88] Martin AJP. The Development of Partition Chromatography. Elsevier 1964.
- [89] Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol* 2011;681:439-47.
- [90] Roque AC, Lowe CR. Affinity chromatography: history, perspectives, limitations and prospects. *Methods Mol Biol* 2008;421:1-21.

- [91] HealthCare G. Affinity Chromatography - Principles and Methods: GE HealthCare; 2007.
- [92] Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol* 2009;463:439-73.
- [93] Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* 1993;18:223-30.
- [94] Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol* 2011;681:259-80.
- [95] Kopperschlager G, ; Bohme, H-J.,; Hofmann E.,. Cibacron Blue F3G-A and Related Dyes as Ligands in Affinity Chromatography: Springer; 2015.
- [96] Yamamoto S, ; Nakanishi, K.,; Matsuno, R., . Ion-Exchange Chromatography: Marcel Dekker; 1988.
- [97] HealthCare G. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: GE HealthCare; 2010.
- [98] Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 2006;48:1-13.
- [99] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011;80:283-93.
- [100] Davey J, Lord M. Essential cell biology : a practical approach. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2003.
- [101] Fischer EH, Krebs, E. G. Muscle Phosphorylase-B. *Methods in Enzymology* 1962;5:369-73.
- [102] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3784-8.
- [103] Truman A, ; Hook, B. A TEV Protease Compatible with Inhibitory Compounds from Protein Purification. 2013.
- [104] Lukacs CM, Oikonomakos NG, Crowther RL, Hong LN, Kammlott RU, Levin W, et al. The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: an intermediate conformation with T-state and R-state features. *Proteins* 2006;63:1123-6.
- [105] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem* 2010;18:3413-25.
- [106] Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985;148:277-81.
- [107] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998.
- [108] Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:355-67.

- [109] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [110] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.
- [111] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.
- [112] Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.
- [113] McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:386-94.
- [114] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-5.
- [115] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 1995;8:127-34.
- [116] Witters LA, Avruch J. Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry* 1978;17:406-10.