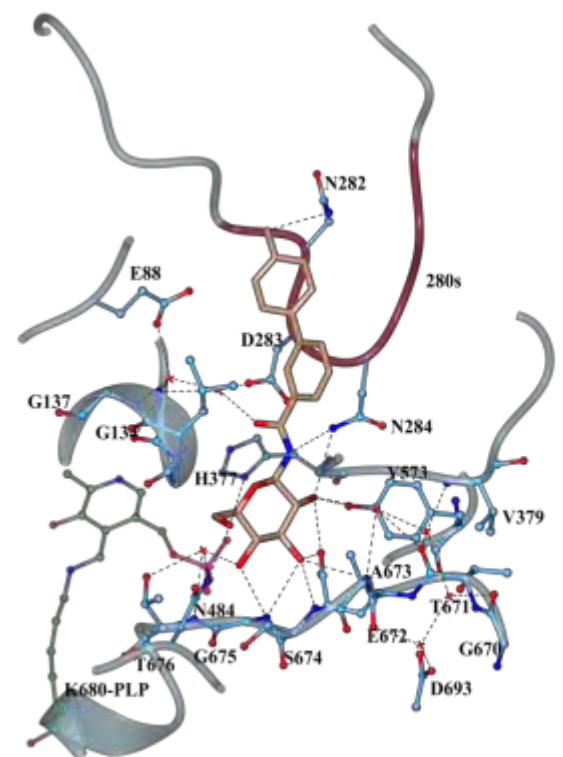
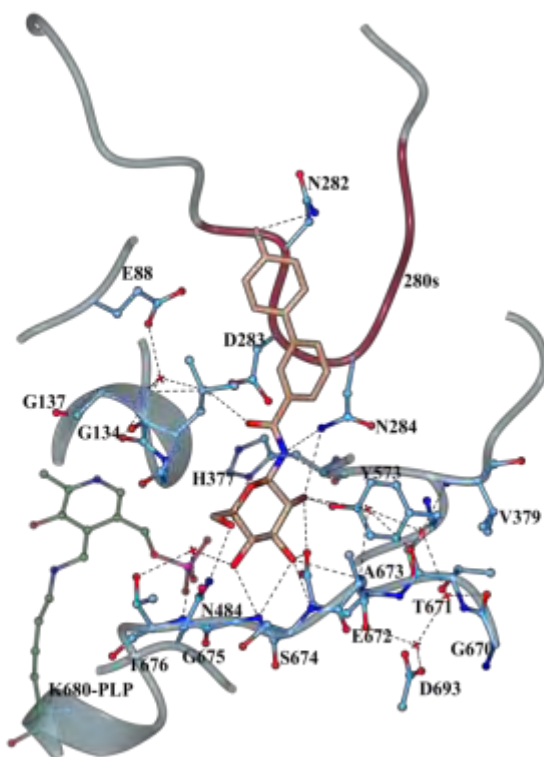




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**



Τσαγκαράκου Αναστασία

ΛΑΡΙΣΑ 2017

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**BIOCHEMICAL STUDIES ON INHIBITORS OF GLYCOGEN
PHOSPHORYLASE**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

ΟΝΟΜΑ: ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, 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

Στη γιαγιά μου Αναστασία...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. Περίληψη.....	7
II. Abstract.....	8
III. Ευχαριστίες.....	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	11
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου I.....	12
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου II.....	13
1.2. Ινσουλίνη.....	15
1.2.1 Χημεία και σύνθεση της ινσουλίνης.....	
1.2.2 Ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυτταρικών στόχων από την ινσουλίνη.....	16
1.2.3 Επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων.....	16
1.2.4 Αντίσταση στην ινσουλίνη.....	17
1.2.5 Θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη.....	17
1.3 Γλυκαγόνη.....	18
1.4 Γλυκογόνο.....	18
1.4.1 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	19
1.4.2. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	19
1.5 Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	21
1.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	22
1.6.1 Ενεργειακό πλεονέκτημα.....	24
1.6.2 Συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	24
1.6.3 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	26
1.6.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	30
1.7 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	31
1.7.1 Αλλοστερισμός στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	33
1.7.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	34
1.8 Κρυσταλλογραφία.....	37
1.8.1 Τι είναι κρύσταλλος;.....	37
1.8.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	39
1.8.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης.....	42
1.8.4 Η θεωρία της πείθλασης των ακτίνων X.....	43
1.8.5 Ο νόμος του Bragg.....	43
1.8.6 Βελτιστοποίηση Μοριακού Μοντέλου.....	45
1.8.7 Διάγραμμα Ramachandran.....	46
1.8.8 Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X αποκαλύπτει την τρισδιάστατη δομή σε ατομικό επίπεδο.....	47
IV. Σκοπός.....	48
2. Υλικά και μέθοδοι.....	49
2.1 Αντιδραστήρια.....	50
2.2 Οργανολογία.....	51
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	51
2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας.....	52

2.5 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	52
2.6 Υγρή χρωματογραφία και σύστημα FPLC.....	52
2.6.1 Χρωματογραφία συγγένειας.....	53
2.6.1.1 Στήλη με ακινητοποιημένα Ni ²⁺	54
2.7 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής-Ion Exchange Chromatography (IEX).....	55
2.8 Αφαίρεση της ετικέτας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	58
2.8.1 Πρωτεάσες TEV και 3C.....	58
2.9 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb).....	58
2.10 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	65
2.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-Πηκτώματα.....	68
2.12 Χρώση πηκτωμάτων.....	72
2.13 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών- Μέθοδος Bradford.....	72
2.14 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής GP (hlGP).....	72
2.15 Φωσφορυλίωση της hlGPb.....	75
2.16 Κινητικές μελέτες έναντι της GP.....	76
2.16.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της φωσφορυλάσης.....	76
2.16.2 Ενζυμικό διάλυμα.....	77
2.16.3 Υποστρώματα.....	77
2.16.4 Πειραματική διαδικασία.....	79
2.16.5 Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	80
2.17 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	82
2.18 Βελτιστοποίηση δομικού μοντέλου.....	83
3.Αποτελέσματα.....	85
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών.....	86
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της rmGPb.....	86
3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της hlGPa.....	86
3.2 Κινητικές μελέτες.....	90
3.2.1 Προσδιορισμός K _i του αναστολέα 6072 έναντι της rmGPb.....	90
3.2.2 Προσδιορισμός K _i του αναστολέα 6072 έναντι της hlGPa.....	90
3.3 Δομικά αποτελέσματα.....	91
V. Συζήτηση.....	96
VI. Παράρτημα.....	98
4. Βιβλιογραφία.....	99

I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Είναι μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, που προκύπτει είτε από ελαττώματα στην έκκριση ινσουλίνης, είτε στη δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τους φαρμακευτικούς στόχους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παράγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η GP αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων για τη θεραπεία του ΣΔ. 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, ώστε να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της GP από κονίκλους (rmGP) και της ανθρώπινης ηπατικής GP (hlGP) από μετασχηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα ΆΚΤΑ-FPLC. Μελετήθηκε η σύνδεση ενός αναλόγου γλυκόζης (6072) στις δύο ισομορφές της GP με κινητικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση της πρόσδεσης του αναστολέα 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 τον 6072 έναντι της hlGPa ήταν 46.1μM, και έναντι της rmGPb ήταν 56.1μM.

II. Abstract

Diabetes mellitus (DM), one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterised by elevated blood glucose levels. It is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, resulting either from defects in insulin secretion, or insulin action, or both. Enzymes and hormone receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the structure-based design of potential antihyperglycaemic drugs. Glycogen phosphorylase (GP) is a key enzyme involved in glycogen metabolism by catalyzing the first step of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (G1P). GP is a validated pharmaceutical target for the discovery of new potential anti-hyperglycemic compounds for the treatment of DM. GP has at least six regulatory sites with the catalytic site being the most well studied for drug design. The majority of these studies use the 3D structure of GP to design new anti hyperglycaemic agents. In this study we isolated and purified GPb from rabbit muscle (rmGPb), and human liver GPb (hlGPb) from recombinant bacteria using the automated ÄKTA-FPLC system. The binding of a glucose analogue (6072) to GP has been studied with kinetics and crystallographic studies. Structural analysis revealed that this inhibitor binds at the catalytic site of the enzyme. The K_i values measured for the inhibitor 6072 were 56.1 μM and 46.1 μM for rmGPb and hlGPb, respectively.

III. Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Νοέμβριο του 2016 έως τον Ιούνιο του 2017.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του TBB, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα για την επίβλεψη του και που μου έδωσε τη δυνατότητα να ζήσω και να εξοικειωθώ περαιτέρω με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου βιοεπιστημών δίνοντας μου γνώσεις και εμπειρίες που θα μου φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μετέπειτα ακαδημαϊκή μου πορεία. Αισθάνομαι, επίσης την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Κοντού Μαρία, και Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου για την εκπόνηση του θέματος, όπως και για τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση για τη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών.

Δε θα μπορούσα βέβαια να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη στήριξη και τη βοήθεια τους. Βέβαια ξεχωριστή θέση κατέχουν ιδιαιτέρως οι υποψήφιοι διδάκτορες Ευθύμιος Κυριάκης και Γιώργος Στραβοδήμος για την κάθε φύσης βοήθεια και στήριξη τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ηθικό επίπεδο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την υποψήφια διδάκτωρ Όλγα Παπαϊωάννου, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και καλή φίλη Μυρτώ Πατρασκάκη και τους προπτυχιακούς φοιτητές Βασιλική Αδάμου Ανδρουλάκη, Ευγενία Σταμάτη, Θωμά Μπάρκα, Αγγελική Εξάρχου και Άλκηστις Γκέρδη. Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου. Επίσης, τους υποψήφιους διδάκτορες Βύρωνα Γοργογιέτα, Ραφαηλία Μπέτα, Θεοδώρα Σολοβού, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αναστασία Γκούσκου και κυρίως τον προπτυχιακό φοιτητή, αξιόλογο συνεργάτη και φίλο Συμεών Κούλα. Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στον καθ. Rainer Riedl για τη σύνθεση του αναστολέα και τον Δρ. Ζωγράφο Σπύρο για τη συνεισφορά του στη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου Αγγελική Κολτσίδα, Σταυρούλα Κολτσίδα, Ελευθερία Μαράνου, Ζωή Τσανή και Γιώργο Περίφανο για την υποστήριξη τους καθώς χωρίς τη βοήθεια και την υπομονή τους δεν θα είχα καταφέρει να φέρω εις πέρας την παρούσα διπλωματική εργασία.

- **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Η πρώτη σαφής και πλήρης περιγραφή του διαβήτη έγινε από τον Αρεταίο της Καππαδοκίας, διάσημο γιατρό της ύστερης ελληνιστικής περιόδου. Η ανάλυσή του για το διαβήτη αντιπροσωπεύει, στην πραγματικότητα, το μόνο εκτεταμένο κείμενο της υπάρχουσας ελληνικής ιατρικής βιβλιογραφίας. Ο Αρεταίος ήταν αυτός που εισήγαγε πρώτος στην ιατρική ορολογία τον όρο “διαβήτη” 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 μέγας εύρος γνώσεων, την ευθυκρισία και την ακρίβεια της συγγραφής [1]. Τα τελευταία χρόνια γίνονται συνεχώς εκτιμήσεις σχετικά με τον πληθυσμό που αναμένεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη μέσα στις επόμενες δεκαετίες. Το 2013 έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι και ο αριθμός αυτός αναμένεται να ανέλθει στα 592 εκατομμύρια έως το 2035 σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) [2].

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα καθώς υπάρχει μεγάλη διακύμανση ως προς τις αιτίες εκδήλωσής του. 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 και ψυχοκοινωνικούς παράγοντες, οδηγώντας έτσι στον κίνδυνο εκδήλωσης σακχαρώδους διαβήτη, διαφέρει ακόμα και ανάμεσα στις διάφορες χώρες [3,4]. Τα συμπτώματα του σακχαρώδη διαβήτη περιλαμβάνουν πολυουρία, πολυδιψία, απώλεια βάρους, μερικές φορές με πολυφαγία και θολή όραση. Οι οξείες, απειλητικές για τη ζωή συνέπειες του διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία με κετοξέωση. Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές του διαβήτη περιλαμβάνουν αμφιβληστροειδοπάθεια με πιθανή απώλεια της όρασης, νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, γαστρεντερικά, ουρογεννητικά και καρδιαγγειακά συμπτώματα και σεξουαλική δυσλειτουργία. Οι ασθενείς με διαβήτη έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής, περιφερικής αρτηριακής και εγκεφαλοαγγειακής νόσου καθώς η υπέρταση και οι ανωμαλίες του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών είναι συνήθη στους ασθενείς αυτούς [5].

Ο ΣΔ διακρίνεται σε:

1. σακχαρώδη διαβήτη τύπου I,
2. σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και
3. 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, ενδοκρिनοπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος, διαβήτης επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά κ.α. όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1. [5].

I. Type 1 diabetes (β-cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency)

A. Immune mediated

B. Idiopathic

II. Type 2 diabetes (may range from predominantly insulin resistance with relative insulin deficiency to a predominantly secretory defect with insulin resistance)

III. Other specific types

A. Genetic defects of β-cell function

1. Chromosome 12, HNF-1α (MODY3)
2. Chromosome 7, glucokinase (MODY2)
3. Chromosome 20, HNF-4α (MODY1)
4. Chromosome 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)
5. Chromosome 17, HNF-1β (MODY5)
6. Chromosome 2, *NeuroDI* (MODY6)
7. Mitochondrial DNA
8. Others

B. Genetic defects in insulin action

1. Type A insulin resistance
2. Leprechaunism
3. Rabson-Mendenhall syndrome
4. Lipotrophic diabetes
5. Others

C. Diseases of the exocrine pancreas

1. Pancreatitis
2. Trauma/pancreatectomy
3. Neoplasia
4. Cystic fibrosis
5. Hemochromatosis
6. Fibrocalculous pancreatopathy
7. Others

D. Endocrinopathies

1. Acromegaly
2. Cushing's syndrome
3. Glucagonoma
4. Pheochromocytoma
5. Hyperthyroidism
6. Somatostatinoma
7. Aldosteronoma
8. Others

E. Drug or chemical induced

1. Vacor
2. Pentamidine
3. Nicotinic acid
4. Glucocorticoids
5. Thyroid hormone
6. Diazoxide
7. β-adrenergic agonists
8. Thiazides
9. Dilantin
10. γ-Interferon
11. Others

F. Infections

1. Congenital rubella
2. Cytomegalovirus
3. Others

G. Uncommon forms of immune-mediated diabetes

1. "Stiff-man" syndrome
2. Anti-insulin receptor antibodies
3. Others

H. Other genetic syndromes sometimes associated with diabetes

1. Down syndrome
2. Klinefelter syndrome
3. Turner syndrome
4. Wolfram syndrome
5. Friedreich ataxia
6. Huntington chorea
7. Laurence-Moon-Biedl syndrome
8. Myotonic dystrophy
9. Porphyria
10. Prader-Willi syndrome
11. Others

IV. Gestational diabetes mellitus

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες του σακχαρώδη διαβήτη [5].

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (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 [5]. Τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών, κορτιζόλης και αυξητικής ορμόνης θα ενεργοποιήσουν την ευαίσθητη σε ορμόνες λιπάση, η οποία θα προκαλέσει την αποσύνθεση των τριγλυκεριδίων και την απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα απορροφώνται από το ήπαρ και μετατρέπονται σε κετόνες που απελευθερώνονται στην 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 [6].

Οι περισσότερες περιπτώσεις διαβήτη τύπου 1 αντιπροσωπεύουν μια ανοσοποιητική, αν όχι αυτοάνοση/διαμεσολαβούμενη διαταραχή, που σημαίνει ότι οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ανοσολογικής συμβολής στην παθογένεια της νόσου (π.χ. αυτοαντισώματα ή γενετικοί συσχετισμοί με γονίδια που ελέγχουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις). Ωστόσο, δεν έχουν όλοι οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 αυτά τα χαρακτηριστικά, οδηγώντας σε προτεινόμενες ταξινομήσεις του τύπου 1Α (αυτοάνοσο) διαβήτη, για το 70-90% των ασθενών με νόσο τύπου 1 που έχουν ανοσολογικά αυτοαντιδραστικά/αυτοαντισώματα και τύπου 1Β (Ιδιοπαθή) διαβήτη, που αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο του οποίου η συγκεκριμένη παθογένεση παραμένει ασαφής [7].

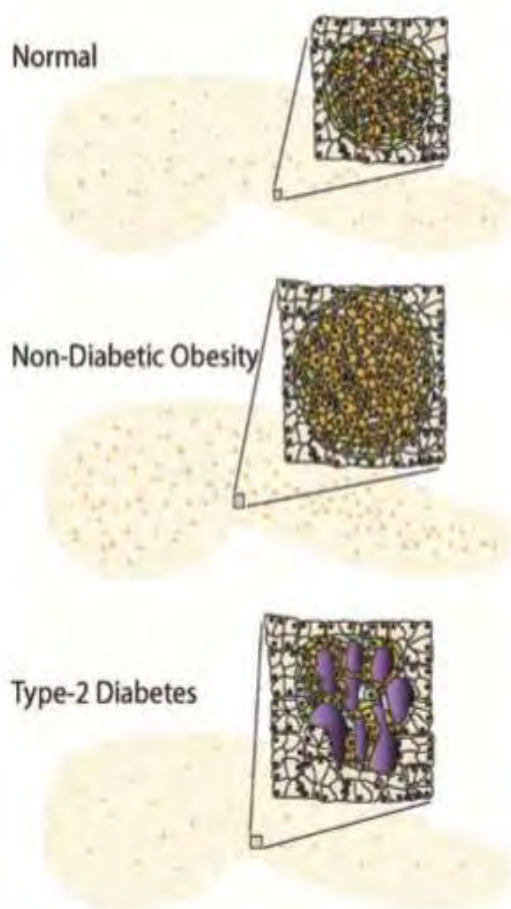
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 που ονομάζεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία προς την ινσουλίνη συχνά αναφέρεται ως αντίσταση στην ινσουλίνη [8].

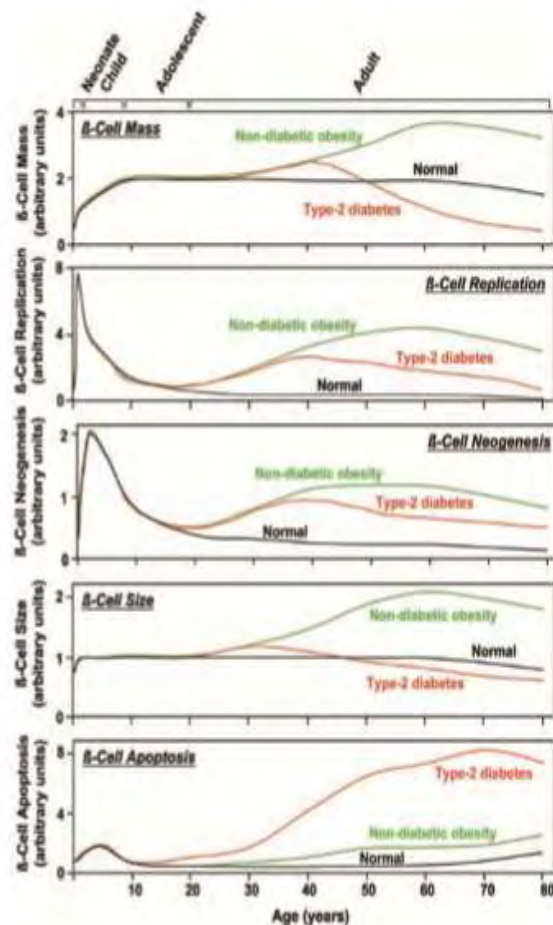
Στο διαβήτη τύπου 2, τα β κύτταρα του παγκρέατος αποτυγχάνουν να παράγουν αρκετή ινσουλίνη για να καλύψουν τη ζήτηση του σώματος, εν μέρει λόγω μιας επίκτητης μείωσης της μάζας β-κυττάρων. Στους ενήλικες, η μάζα των παγκρεατικών β-κυττάρων ελέγχεται από διάφορους μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την αντιγραφή, τη νεογένεση, την υπερτροφία και την επιβίωση. Αν και υπάρχει μια πολύ μικρή ισορροπία μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη και μιας αποτελεσματικής μάζας β-κυττάρων, η β-κυτταρική μάζα προσαρμόζεται επαρκώς για να αντισταθμίσει τις μεταβολές στο μεταβολικό φορτίο. Τελικά η β-κυτταρική μάζα αποτυγχάνει να αντισταθμίσει την αντίσταση στην ινσουλίνη, και ο διαβήτης τύπου 2 ακολουθεί. Αυτή η αποτυχία προκαλείται από μια σημαντική αύξηση της απόπτωσης των β-

κυττάρων, που πιθανότατα προκαλείται από ένα συνδυασμό χρόνιας υπεργλυκαιμίας, υπερλιπιδαιμίας και / ή ορισμένων κυτοκινών που παρεμβαίνουν στις οδούς σηματοδότησης που διατηρούν την φυσιολογική ανάπτυξη των β-κυττάρων. Αν και μπορεί να υπάρξει μια αρχική αντισταθμιστική αύξηση στη μάζα των β-κυττάρων, η έναρξη του διαβήτη τύπου 2 τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πειραματόζωα (τρωκτικά) συνοδεύεται από μείωση της μάζας β-κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, το σώμα δεν μπορεί πλέον να προσαρμοστεί σε τυχόν αυξήσεις στο μεταβολικό φορτίο, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στην ινσουλίνη που σχετίζεται με την παχυσαρκία. Αυτή η απώλεια β-κυττάρων προκύπτει από μια σημαντική αύξηση της απόπτωσης αυτών, η οποία υπερβαίνει κατά πολύ τις μικρές αυξήσεις στην αντιγραφή των β-κυττάρων και στη νεογένεση (Εικόνα 1.2). Καθώς η διαβητική κατάσταση τύπου 2 εξελίσσεται, η κατάσταση επιδεινώνεται. Η συχνότητα της αντιγραφής του β-κυττάρου μειώνεται με αποτέλεσμα και ο πληθυσμός των β-κυττάρων να μειώνεται (Εικόνα 1.2). Στους ανθρώπους, η αυξημένη απόπτωση β-κυττάρων στον διαβήτη τύπου 2 προκαλεί τη δημιουργία αμυλοειδών πλακών στο πάγκρεας, κάτι το οποίο οφείλεται στο σχηματισμό ινιδίων από την ινσουλίνη. (Εικόνα 1.1) [9].

Εικόνα 1.1: 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 (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) 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 [9].



Εικόνα 1.2: Ένα υποθετικό μοντέλο για μεταγεννητική ανάπτυξη παγκρεατικών β-κυττάρων σε ανθρώπους. Παρουσιάζονται τρεις καταστάσεις: κανονική (μαύρη), μη διαβητική παχυσαρκία (πράσινη) και διαβήτης τύπου 2 (κόκκινο). Ο άνω πίνακας εμφανίζει αλλαγές στη συνολική μάζα των β-κυττάρων (το άθροισμα των αλλαγών στην αντιγραφή, τη νεογένεση και το μέγεθος, εκτός της απόπτωσης των β-κυττάρων, που απεικονίζεται ξεχωριστά στις άλλες τέσσερις ομάδες) [9].

1.2. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη απομονώθηκε από το πάγκρεας σκύλου για πρώτη φορά το 1922 από τους Banting και Best [13]. Έχει συσχετιστεί με το «σάκχαρο του αίματος» και ασκεί ουσιώδη επίδραση στον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Ωστόσο, οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπών, που προκαλούν καταστάσεις όπως οξέωση και αρτηριοσκλήρωση, αποτελούν τις συνήθεις αιτίες θανάτου των διαβητικών ασθενών. Επίσης, σε ασθενείς με μακροχρόνιο διαβήτη η αδυναμία για σύνθεση πρωτεϊνών οδηγεί σε απώλεια των ιστών, καθώς και σε πολλές λειτουργικές διαταραχές των κυττάρων [8].

1.2.1 Χημεία και σύνθεση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι μια πρωτεΐνη (η ανθρώπινη έχει μοριακό βάρος 5.808 Da) και αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Όταν οι δυο αλυσίδες των αμινοξέων διαχωρίζονται

η λειτουργική δραστηριότητα του μορίου της ινσουλίνης μηδενίζεται. Συντίθεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος με τον συνήθη μηχανισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης και αρχικά σχηματίζεται η προϊνσουλίνη που αποτελείται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες Α, Β και C. Το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης κόβεται, περαιτέρω, σε μικρότερα κομμάτια στη συσκευή *Golgi* και έτσι παράγεται η ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από την Α και Β αλυσίδα που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς [8].

1.2.2 Ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυττάρων στόχων από την ινσουλίνη.

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 [10].

1.2.3. Επίδραση της ινσουλίνης στον μεταβολισμό των υδατανθράκων

Αμέσως μετά από γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η γλυκόζη που απορροφάται προς το αίμα προκαλεί ταχεία έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη με την σειρά της, προκαλεί ταχεία πρόσληψη, αποθήκευση και χρήση της γλυκόζης από όλους σχεδόν τους ιστούς του σώματος, αλλά ιδιαίτερα από τους μύες, τον λιπώδη ιστό και το ήπαρ. Μία από τις σημαντικότερες επιδράσεις της ινσουλίνης είναι η προαγωγή της αποθήκευσης του μεγαλύτερου μέρους της γλυκόζης που απορροφάται από το έντερο μετά από γεύμα σχεδόν αμέσως στο ήπαρ, με τη μορφή γλυκογόνου. Στη συνέχεια, στα μεταξύ των γευμάτων χρονικά διαστήματα, όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη τροφή και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αρχίζει να ελαττώνεται, η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται και το γλυκογόνο του ήπατος αρχίζει να διασπάται προς γλυκόζη, που αποδίδεται προς το αίμα για τη διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε ικανοποιητικό επίπεδο [8].

1.2.4. Αντίσταση στην ινσουλίνη

Η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και το μεταβολικό σύνδρομο συνήθως προϋπάρχουν κατά την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2. Η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και η μείωση του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι σταδιακά αναπτυσσόμενες καταστάσεις, που αρχίζουν με την αύξηση του σωματικού βάρους και την παχυσαρκία. Η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη αποτελεί μέρος μιας σειράς διαταραχών που συχνά καλείται ‘μεταβολικό σύνδρομο’. Ορισμένα χαρακτηριστικά του συνδρόμου αυτού είναι:

1. Παχυσαρκία και ιδιαίτερα η εναπόθεση λίπους στην κοιλιακή χώρα
2. Η αντίσταση στην ινσουλίνη
3. Η υπεργλυκαιμία της νηστείας
4. Οι λιπιδικές διαταραχές
5. Η υπέρταση

Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου είναι άμεσα συνδεδεμένα με την υπερβολική αύξηση του βάρους.

Παρόλο που οι περισσότεροι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 είναι υπέρβαροι ή έχουν σημαντική εναπόθεση λίπους στα εσωτερικά όργανα, η ανάπτυξη ικανής ιστικής αντίστασης στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2 μπορεί να οφείλεται και σε άλλες επίκτητες ή γενετικές καταστάσεις που μειώνουν την ευαισθησία των περιφερικών ιστών προς την ινσουλίνη [8].

1.2.5. Θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 γίνεται με χορήγηση αρκετής ινσουλίνης ώστε ο ασθενής να έχει όσο το δυνατόν πιο φυσιολογικό μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών. Η ινσουλίνη διατίθεται σε διάφορες μορφές. Συνήθως ο ασθενής με σοβαρό διαβήτη τύπου 1 δέχεται ημερήσια εφάπαξ δόση ινσουλίνης παρατεταμένης δράσης, ώστε να αυξηθεί ο μεταβολισμός των υδατανθράκων καθ’ όλη τη διάρκεια της ημέρας. Στη συνέχεια, πρόσθετες ποσότητες της συνήθους ινσουλίνης χορηγούνται κατά την διάρκεια της ημέρας όταν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος τείνουν να αυξηθούν όπως και κατά την διάρκεια των γευμάτων. Επομένως η θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη εξατομικεύεται για κάθε ασθενή.

Στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, συνιστάται η μείωση του σωματικού βάρους και η καθημερινή άσκηση, ώστε να αναστραφεί η ιστική αντίσταση προς την ινσουλίνη. Αν τα μέτρα αυτά αποτυγχάνουν, τότε πρέπει να χορηγηθούν φάρμακα που αυξάνουν την ιστική ευαισθησία προς την ινσουλίνη ή που διεγείρουν την αυξημένη σύνθεση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Παρ’ όλα αυτά, σε πολλούς ασθενείς απαιτείται η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης, για τη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος [8].

1.3 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τα άλφα κύτταρα των νησιδίων του *Langerhans* όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ελαττώνεται. Έχει μοριακό βάρος 3.845 Da και αποτελείται από αλυσίδα με 29 αμινοξέα. Οι κύριες επιδράσεις της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι η διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος (γλυκογονόλυση) και η αύξηση της νεογλυκονογένεσης στο ήπαρ. Η γλυκαγόνη προάγει την γλυκογονόλυση με τον εξής τρόπο:

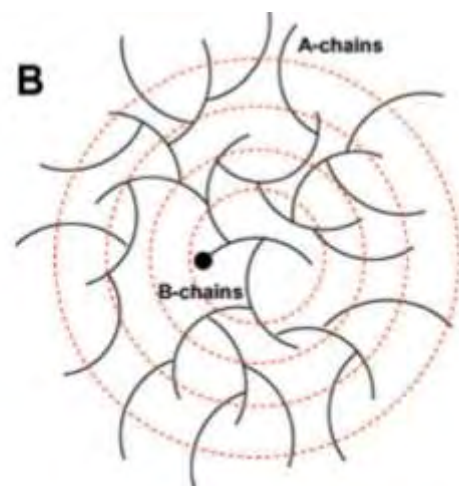
1. Η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση στην μεμβράνη των ηπατοκυττάρων
2. Σχηματισμός κυκλικής AMP
3. Ενεργοποίηση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης της πρωτεϊνικής κινάσης
4. Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης
5. Ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορύλασης
6. Μετατροπή της φωσφορυλάσης β σε φωσφορυλάσης α με φωσφορυλίωση
7. Διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκοζο-1-φωσφορικό
8. Αποφωσφορυλίωση και απελευθέρωση της γλυκόζης από τα ηπατικά κύτταρα.

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 [8].

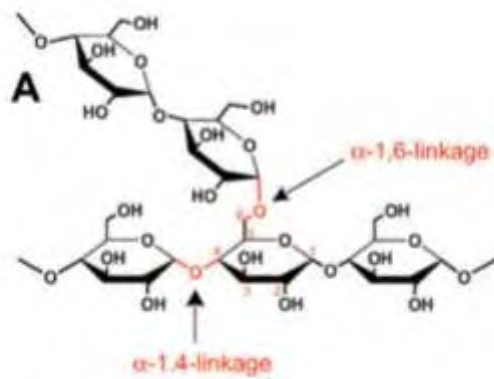
1.4. Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο χρησιμεύει ως ένα ωσμωτικά ουδέτερο μέσο για την αποθήκευση της γλυκόζης σε κύτταρα σε περιόδους θρεπτικής αφθονίας για χρήση σε περιόδους ανάγκης. Το γλυκογόνο υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς, από τα βακτήρια και τα αρχαία, έως και τον άνθρωπο. Τα φυτά συνθέτουν συναφή πολυμερή γλυκόζης με τη μορφή αμύλου που αποτελείται από αμυλοπεκτίνη, έναν πολυσακχαρίτη χημικώς παρόμοιο με το γλυκογόνο και αμυλόζη, που είναι ένα ουσιαστικά μη διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης. Επομένως, ο πολυμερισμός της γλυκόζης μπορεί να είναι ένας καθολικός μηχανισμός αποθήκευσης ενέργειας στη φύση.

Ο πρωταρχικός πολυμερισμός του γλυκογόνου παρέχεται 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 Β-αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν συνήθως δύο διακλαδώσεις, και ως εξωτερικές Α-αλυσίδες, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες. (Εικ.1.3) [11].



Εικόνα 1.3: 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.

1.4.1. Σύνθεση του γλυκογόνου

Η άμεση οδός σύνθεσης του γλυκογόνου απαιτεί τη μεταφορά γλυκόζης σε κύτταρα, από ένα ή περισσότερους μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs). Για παράδειγμα, ο GLUT1 είναι ευρέως κατανομημένος και παρέχει βασική μεταφορά γλυκόζης. Ο GLUT4 ρυθμίζεται από την ινσουλίνη και είναι σημαντικός για τους ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς όπως ο σκελετικός μυς και ο λιπώδης ιστός. Και ο GLUT2 υπάρχει στο ήπαρ και στα β-κύτταρα του παγκρέατος και αναγνωρίζει τη γλυκόζη με βάση τη θετική μεταβολή της γλυκόζης μεταξύ του αίματος και του ιστού. Το 1957, ο Luis Lenoir έδειξε ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη συντίθεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) σε μία αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Υπάρχει ένα εξειδικευμένο βήμα έναρξης στο οποίο η γλυκογενίνη αυτο-γλυκοζυλιώνεται για να σχηματίσει μια αλυσίδα εναρκτηραολιγοσακχαριτών. Η γλυκογονίνη, μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με τη συνθάση του γλυκογόνου που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών, χρησιμοποιώντας επίσης UDP-γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου. Τα α-1,6-γλυκοσιδικά σημεία σχηματίζονται από την δράση του ενζύμου διακλάδωσης [11].

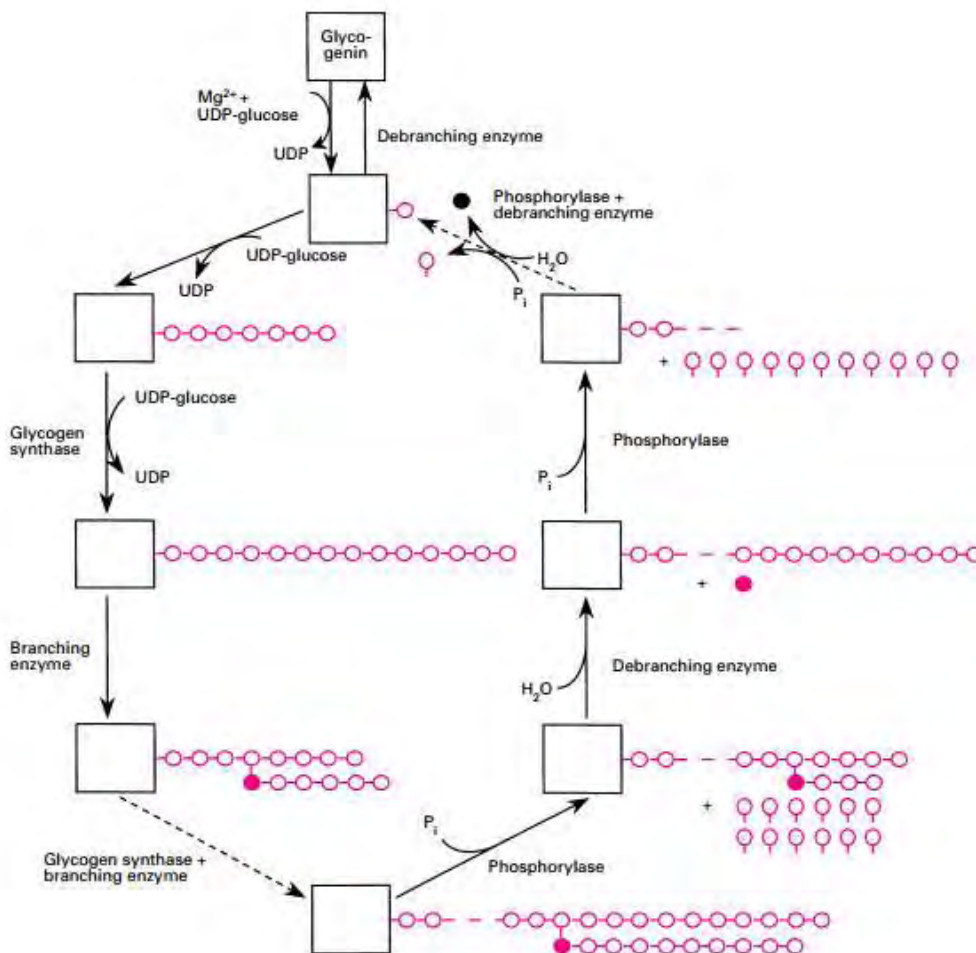
1.4.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες: μία να αποικοδομεί το γλυκογόνο, δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και μία να μετατρέπει το προϊόν του καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό. Παρακάτω εξετάζεται καθεμία από

αυτές τις δραστηριότητες. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συνίσταται σε τρία βήματα:

1. απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο,
2. ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση
3. μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6 φωσφορική γλυκόζη. [10]

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 ενζύμων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.4:



Εικόνα 1.4: Στάδια της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. [12]

ο Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού P_i προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. 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 [10].

ο Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου

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. [10]

1.5 Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

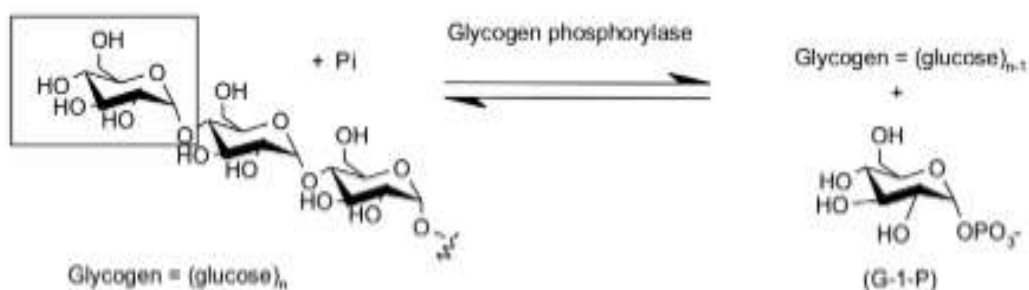
Η κινάση φωσφορυλάσης (PhK) είναι ένα βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στον έλεγχο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Το ένζυμο ανταποκρίνεται σε σήματα που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις υποδοχέα ορμόνης και από νευρωνικούς παλμούς που μεσολαβούν μέσω ασβεστίου με εκείνους που προκύπτουν από ενδοκυτταρικά συμβάντα, για να παρέχουν μια ελεγχόμενη δραστηριότητα κινάσης η οποία ρυθμίζει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η PhK είναι μια από τις μεγαλύτερες πρωτεϊνικές κινάσες και αποτελείται από τέσσερις τύπους υπομονάδας, με στοιχειομετρία (αβγδ)₄ συνολικού μοριακού βάρους 1.3x10⁶ kDa. Οι α και β υπομονάδες είναι ρυθμιστικές. Η υπομονάδα δ είναι ουσιαστικά ταυτόσημη με την καλμοδουλίνη και προσδίδει ευαισθησία σε Ca²⁺. Η γ-υπομονάδα 386 αμινοξέων είναι η καταλυτική υπομονάδα η οποία περιλαμβάνει μια περιοχή N-τελικής κινάσης (κατάλοιπα 1-298) και μία ρυθμιστική περιοχή δέσμευσης καλμοδουλίνης (κατάλοιπα 299-386) [14]. 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 [15].

Η PhK ενεργοποιείται από την PKA με φωσφορυλίωση στη β-υπομονάδα της. Επιπλέον η PhK μπορεί να ενεργοποιηθεί εν μέρει, από επίπεδα Ca²⁺ 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 δραστηριότητα μόνο ύστερα από φωσφορυλίωση της υπομονάδα β και ενεργοποίηση της υπομονάδας δ με δέσμευση Ca^{2+} [10].

1.6 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 1.4.2, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου. Καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου (τα άκρα με μια ελεύθερη 4-υδροξυλική ομάδα). Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση α στον C-1

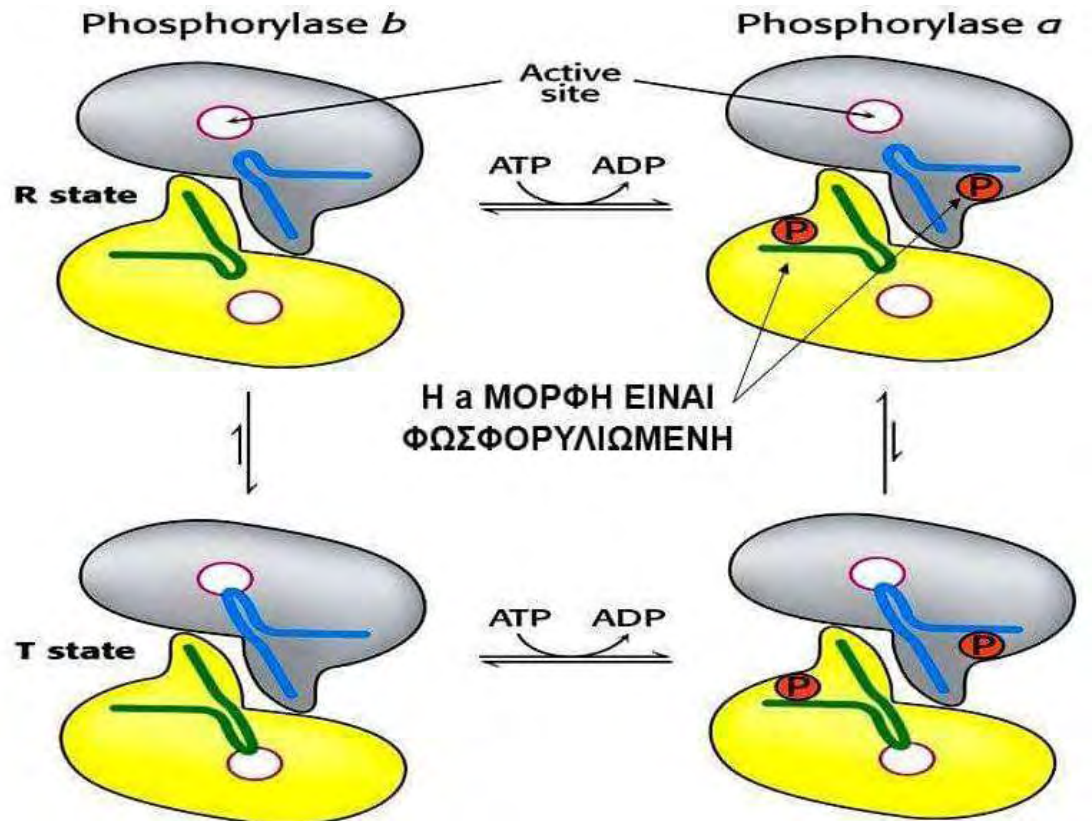


διατηρείται.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *invitro* και ο λόγος ισορροπίας της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς το ορθοφωσφορικό είναι 0,28 σε pH 6,8. Ωστόσο, το ένζυμο *invivo* δρα μόνο προς την κατεύθυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου, επειδή στο κύτταρο η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης [10].

Υπάρχουν 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου οι οποίες εκφράζονται στον εγκέφαλο στους μύες και στο ήπαρ και έχουν περίπου 80% ομολογία. Η GP ελέγχεται από αλλοστερικούς τελεστές και αναστρέψιμη φωσφορυλίωση. Υπάρχει σε δύο τουλάχιστον αλληλομετατρέψιμες μορφές, μία κατάσταση Τα, χαμηλής δραστηριότητας και εξειδίκευσης υποστρώματος, και μία κατάσταση υψηλής δραστηριότητας και εξειδίκευσης υποστρώματος R, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Η φωσφορυλίωση από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) στη Ser14 ή η δέσμευση διαφόρων αλλοστερικών ενεργοποιητών, όπως η AMP, μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση R. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική φωσφατάση ή η δέσμευση αναστολέων όπως η γλυκόζη προάγουν τη μετάβαση από την κατάσταση R σε T. Το ενεργό φωσφορυλιωμένο ένζυμο (GPα) είναι η κύρια μορφή της GP στο ήπαρ, ενώ η μη φωσφορυλιωμένη

ανενεργή μορφή (GPb) είναι η επικρατούσα μορφή στον ήρεμο μυ. Εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση συμβαίνουν στην τριτοταγή δομή κατά τη μετάβαση από την κατάσταση T προς την R. Αυτές οι αλλαγές εμφανίζονται κυρίως στην σύνδεση μεταξύ των υπομονάδων και οδηγούν στην αλλαγή του εύκαμπτου βρόχου 280s (κατάλοιπα 282 έως 285) από μια διαμόρφωση που δεν επιτρέπει την πρόσβαση στην καταλυτική θέση του ενζύμου (κατάσταση T) σε αυτή που επιτρέπει τη δέσμευση του υποστρώματος (κατάσταση R) [16].



Εικόνα 1.5: Η φωσφορυλάση α και η φωσφορυλάση β βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης T. Η φωσφορυλάση β είναι συνήθως ανενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση T. η φωσφορυλάση α είναι συνήθως ενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση R. Οι ρυθμιστικές δομές δείχνονται με μπλε και πράσινο [10].

Η θέση ισορροπίας της φωσφορυλάσης β μεταξύ των καταστάσεων T και R ανταποκρίνεται στις συνθήκες του κυττάρου. Η μυϊκή φωσφορυλάση β (muscleGP) είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης β στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, αναταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης β από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από τις περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες, η φωσφορυλάση β είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών αντιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργός, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP,

της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μυς που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή β. Όταν αρχίζει η άσκηση, το αυξημένο επίπεδο της AMP οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης β. Η άσκηση επίσης θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ορμόνης η οποία προκαλεί τη δημιουργία της φωσφορυλιωμένης μορφής α του ενζύμου. Στον άνθρωπο η ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση (liver GP) αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης από την κατάσταση R στην T, απενεργοποιώντας το ένζυμο. Η γλυκόζη λειτουργεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής της φωσφορυλάσης α, καθώς ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παράγωγή γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, όταν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλό. Άρα, αν ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από μερικές άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του γλυκογόνου. Επιπρόσθετα, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο, όπως συμβαίνει σε ένα συσπώμενο μυ [10]. Τέλος, 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. Η BGP μοιάζει δομικά με την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς ενεργοποιείται και αυτή από το AMP, σε αντίθεση με την IGP η οποία δεν ενεργοποιείται [17].

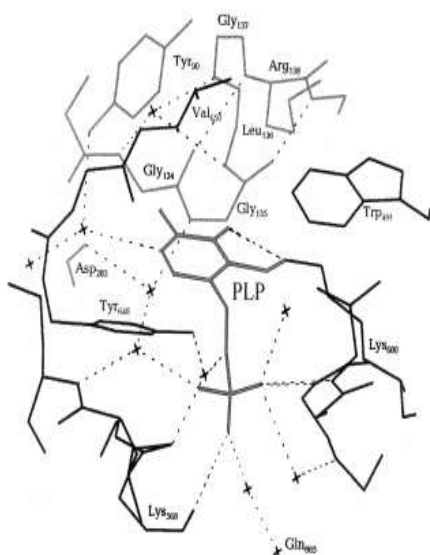
Εκτός όμως από τη φωσφορυλάση των θηλαστικών υπάρχουν και σε άλλους οργανισμού ένζυμα που καταλύουν αντίδραση φωσφορόλυσης, όπως είναι η πατάτα, η *E. coli*, και η ζύμη [18].

1.6.1 Ενεργειακό πλεονέκτημα

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερωμένο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία στην συνέχεια θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, φορτισμένη αρνητικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δεν είναι δυνατόν να διαχυθεί έξω από το κύτταρο [10].

1.6.2 Συμμετοχή φωσφορικής πυριδοξάλης

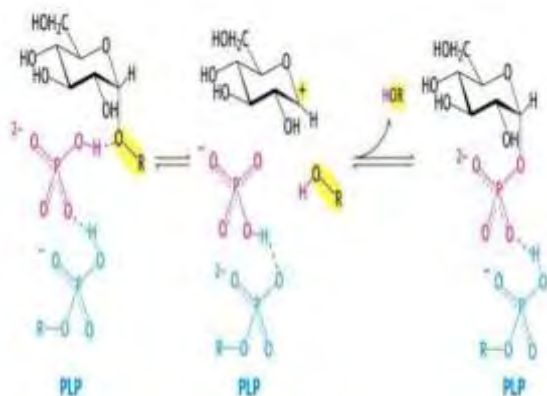
Η 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) ανακαλύφθηκε το 1957 από τον Baranowski στην μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου κονίικλων (rmGPa). Η PLP συμμετέχει ως συμπάροντας σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των αμινοξέων. Το κύριο ενδιαμέσο βήμα στις αντιδράσεις ενός τέτοιου τύπου είναι ο σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ της φωσφορικής πυριδοξάλης και του κατάλληλου αμινοξέος. Αν και η PLP συνδέεται στην Lys680 της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ύπαρξη αυτού του δεσμού δεν είναι απαραίτητη για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη επειδή η φωσφορυλάση καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου και δεν συμμετέχει στον μεταβολισμό των αμινοξέων. Η χρήση διαφορετικών χημικών αναλόγων της PLP με τροποποιήσεις σε κάθε θέση γύρω από τον δακτύλιο πυριδίνης έδειξε ότι η PLP υποστηρίζει την φυσική δομή του ενζύμου και συμμετέχει και στην κατάλυση[19].



Εικόνα 1.6: Παρουσιάζεται η ενεργός περιοχή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η PLP σταθεροποιείται σε μια σταθερή διαμόρφωση μέσω πολλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων του συνενζύμου και των αμινοξικών καταλοίπων των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών περιοχών. Τα μόρια του νερού απεικονίζονται με σταυρούς. [19]

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά μάλλον παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για την φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Διάφορες ενδείξεις παρέχουν πληροφορίες γύρω από το μηχανισμό με τον οποίο η φωσφορυλάση επιτυγχάνει τον αποκλεισμό νερού. Πρώτον, τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Μία άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση του άνθρακα αυτού, διότι η αντίδραση θα προχωρούσε μέσω μιας πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α παρά β , απαιτείται ένας αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά

είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'- φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'- φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [10].



Εικόνα 1.7: Μηχανισμός δράσης της φωσφορολύσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO₄²⁻ (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [10].

1.6.3 Δομή της φωσφορολύσης του γλυκογόνου.

Η φωσφορολύση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές το οποίο αποτελείται από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kDa (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη 680 σε κάθε υπομονάδα, όπως προαναφέρθηκε στο εδάφιο 1.5.2. Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινοτελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπα) και μια καρβοξυτελική δομική περιοχή (360 κατάλοιπα). Η αμινοτελική περιοχή χαρακτηρίζεται από πολλές ρυθμιστικές περιοχές, όπως η σερίνη 14, η οποία τροποποιείται με φωσφορύλωση, το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης AMP, και το κέντρο πρόσδεσης γλυκογόνου. Η καρβοξυτελική περιοχή (360 κατάλοιπα) διαθέτει τη θέση πρόσδεσης του συνενζύμου PLP και μαζί με την αμινοτελική περιοχή σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο το οποίο βρίσκεται σε μια σχισμή που καλύπτεται από μια πύλη αποτελούμενη από κατάλοιπα της N-τελικής περιοχής [10,20].

Έχουν αναγνωρισθεί ακόμη έξι διαφορετικά κέντρα στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Εικ.1.8):

1. Το καταλυτικό κέντρο
2. Το αλλοστερικό κέντρο
3. Το αποθήκευσης του γλυκογόνου
4. Το κέντρο αναστολής
5. Το νέο αλλοστερικό κέντρο
6. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, το οποίο ανακαλύφθηκε πρόσφατα από το εργαστήριο μας[21].



7. Το καταλυτικό κέντρο

Η GP καταλυτική θέση η οποία περιλαμβάνει τον βασικό συμπάραγοντα PLP και βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας της GP, και είναι προσβάσιμη στο διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Οι αναστολείς που δεσμεύονται στην καταλυτική θέση σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος και προωθώντας τη T κατάσταση. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε φωσφορυλάση του γλυκογόνου που προέρχεται από μύες κουνελιών, εξαιτίας της διαθεσιμότητας και της ικανότητας να παράγονται υψηλής ποιότητας κρύσταλλοι. Οι αναστολείς που προσδέονται πιο ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο είναι ανάλογα γλυκόζης. Ο φυσιολογικός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι η α-D-γλυκόζη με σταθερά αναστολής K_i 1,7 mM για την gmGPb, ενώ το ανωμερές β-D-γλυκόζη προσδέεται με σταθερά αναστολής 7,4 mM. Τα ανάλογα γλυκόζης αποτελούν τους πλεόν διερευνημένους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με α- και β- υποκαταστάσεις στο ανωμερικό C1 άτομο [21].



Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της GP αποτελείται από δομικά στοιχεία από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερις β κλώνοι (κατάλοιπα 153-160, 191 193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V η οποία κλείνει από μία περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36' έως 47 της συμμετρικής υπομονάδας, και σχηματίζεται το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αυτό αναγνωρίζει μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως AMP, IMP, ATP, γλυκόζη-6-P, NADH, UDP-γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφορικό. Η 6- φωσφορική γλυκόζη είναι ο πιο ισχυρός φυσιολογικός αναστολέας της GPb ($K_d = 20-70 \mu\text{M}$ για GPb, $K_d = 1700 \mu\text{M}$ GPa) που δεσμεύεται στο αλλοστερικό κέντρο.). Η σύνδεση των προσδετών σε αυτό το

κέντρο αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε ανταγωνίζοντας την AMP που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση T του ενζύμου [21].

⇒ Το αποθήκευσης του γλυκογόνου

Αυτό το κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της GP περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή όπου συνδέεται το γλυκογόνο *ιννίνο*. Το κέντρο αποτελείται από δύο έλικες (κατάλοιπα 396 έως 418 και 420 έως 429) και ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430 έως 432 και κατάλοιπα 437 έως 411). Για την πρόσδεση α- (K_i=47,1mM), β- (K_i=14,1 mM) και γ- (K_i=7,4 mM) κυκλοδεξτρινών στην rmGPb έχουν γίνει κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες. Άλλοι αναστολείς που προσδέονται σε αυτή τη θέση είναι η ακαρβόζη (K_i=26 mM για την rmGPα), μαλτοπεντόζη (G5) και μαλτοεπταόζη (G7) (K_i=1 mM για την rmGPb). Η δομική βάση της πρόσδεσης αυτών των μελετημένων προσδετών (κυκλικών και γραμμικών) είναι παρόμοια και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser429, Lys473 και Asn407 και υδατικές αλληλεπιδράσεις (water mediated interactions) με τα κατάλοιπα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433 [21].

⇒ Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, επίσης γνωστό ως η θέση δέσμευσης καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η δέσμευση των προσδεμάτων σε αυτό το κέντρο οφείλεται κυρίως στην παρεμβολή μεταξύ των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης. Έτσι, η ανασταλτική δραστηριότητα μπορεί να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν τα επίπεδα γλυκόζης πλησιάσουν στο κανονικό, μειώνοντας τον κίνδυνο για υπεργλυκαιμία. Η καφεΐνη ήταν ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε να δεσμεύεται σε αυτό το κέντρο (K_i=0,1 mM). Κατά τη σύνδεση με την rmGPb, η καφεΐνη παρεμβάλλεται μεταξύ 2 αρωματικών καταλοίπων, Phe285 και Tyr613, και σχηματίζει πολλούς δεσμούς VanderWaals. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ωστόσο δεν έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και διαφορετικά φλαβονοειδή προσδέονται σε διαφορετικά κέντρα σύνδεσης της GP[21].

⇒ Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το νέο αλλοστερικό

κέντρο ή θέση πρόσδεσης ινδόλης, βρίσκεται εντός της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τη σύνδεση των δύο υπομονάδων. Η κεντρική κοιλότητα του νέου αλλοστερικού κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα της περιοχής *car* και έλικες α_2 (Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και το άλλο άκρο από τον πύργο α_7 ελίκων (κατάλοιπα Asn270, Glu273, Ser276 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα). Τα 18 αμινοξέα (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ συντηρημένα στην ανθρώπινη ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών, του ήπατος και του εγκεφάλου κονίκλων. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που προσδέονται λειτουργούν σαν κλασσικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T (ανενεργή) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη [21].

⇒ Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Kantsadi et. al., 2015) βρέθηκε ότι ενώ η χρυσίνη και η φλαβοπυριδόλη δεσμεύονται αποκλειστικά στο αλλοστερικό κέντρο, η κερσετίνη προσδέεται σε ένα νέο κέντρο. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Επίσης η βρέθηκε ότι η κερσετίνη είναι το πλέονβιοδραστικό συστατικό ανάμεσα σε 13 πολυφαινολικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από υποπροϊόντα οινοποίησης της ελληνικής ποικιλίας *Vitisvinifera*. Συγκριτική δομική ανάλυση των T και R διαμορφώσεων, μεταξύ του συμπλέγματος rmGPb – κερσετίνης και της ελεύθερης rmGPb, έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην R-κατάσταση, ενώ στην T-κατάσταση (ανενεργός) οι διαφορές ήταν μικρές. Επιπλέον, φαίνεται ότι η πρόσδεση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο ευνοεί την λιγότερο ενεργό κατάσταση T, μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T [21].



Εικόνα 1.8: Κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: **καταλυτικό κέντρο** (1HSU), **κέντρο αναστολής** (3EBP), **κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου** (1P29), **νέο αλλοστερικό κέντρο** (1H5U), **κέντρο πρόσδεσης της κερασεΐνης** (4MRA), **αλλοστερικό κέντρο** (1GPY), **βρόχος 280S** και η **Ser14**.

1.6.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [Oikonomakos 2001]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση

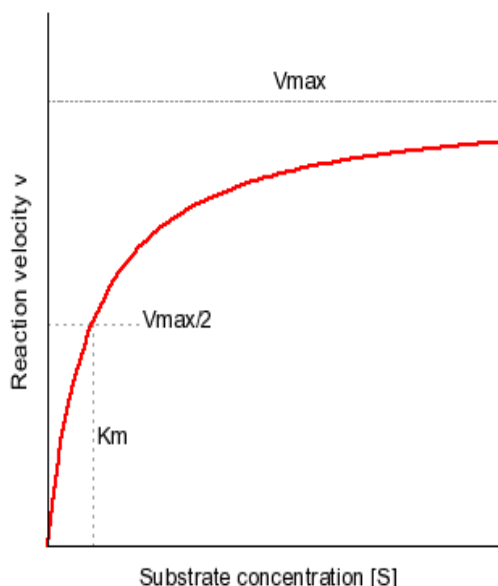
των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [Somsak et al., 2008]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [Oikonomakos et al., 2008].

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση 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), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

1.7 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων, έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης V_0 , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και



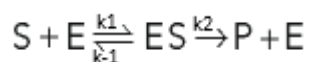
στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος.[10]

Εικόνα 1.9: Κινητική Michaelis-Menten. Ένα διάγραμμα της ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis (k_M) είναι η συγκέντρωση

υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$.

Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis - Menten δημοσίευσαν την, σήμερα πλέον, κλασική 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 τηνιμβερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους[22].

Το μοντέλο που προτάθηκε το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι :



Όπου:

k_1, k_2, k_{-1} : οι σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

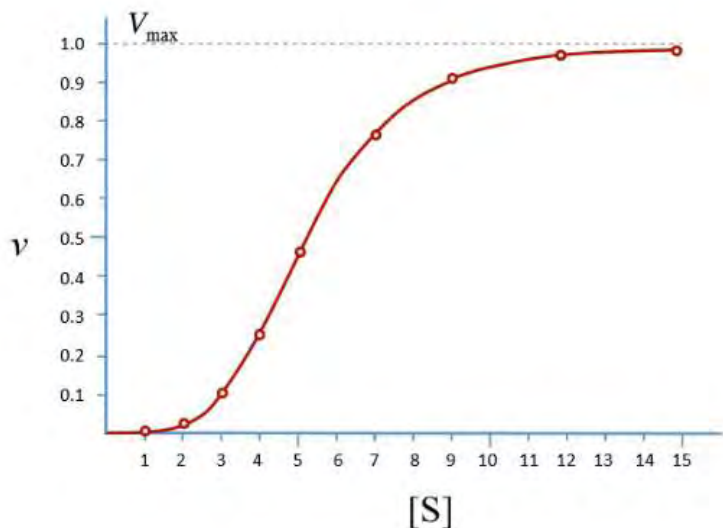
E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Οι Michaelis και Menten κατέληξαν στη μαθηματική σχέση



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

Όπου V_o : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

K_M : σταθερά MichaelisMenten που ορίζεται ως $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Εικόνα 1.10: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από την συγκέντρωση του υποστρώματος.

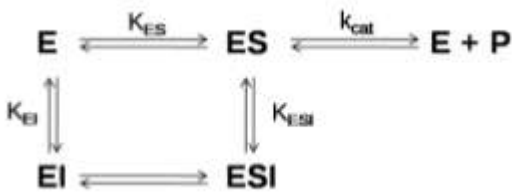
1.7.1 Αλλοστερισμός στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα αλλοστερικά ένζυμα διακρίνονται από την απόκρισή τους στην συγκέντρωση του υποστρώματος και την ευαισθησία τους στη ρύθμιση από άλλα μόρια. Η καμπύλη διαφέρει από την αναμενόμενη για ένα ένζυμο για ένα ένζυμο που ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten. Η παρατηρούμενη καμπύλη αναφέρεται ως σιγμοειδής διότι μοιάζει με ένα 'S'.

Σύμφωνα με το πρότυπο MWC [23], στο οποίο υπακούει και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου b, κάθε μονομερές διαθέτει μία εξειδικευμένη θέση δέσμευσης για κάθε δεσμευτή. Η ύπαρξη σιγμοειδούς καμπύλης οφείλεται στην υπόθεση ισορροπίας μεταξύ της T- και R- διαμόρφωσης. 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 [24].

1.7.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορεί να εξηγηθεί η αναστολή των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι σύμφωνα με το σχήμα που ακολουθεί



Εικόνα 1.11: ένα γενικό σχήμα για την αναστολή ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα K_{ES} , K_{ESI} , K_{EI} , αναπαριστούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ότι είναι ανενεργό.

Στη συναγωνιστική αναστολή η V_{max} παραμένει ανεπηρέαστη, αλλά η φαινομενική K_m αυξάνεται. Ο αναστολέας συγκρατεί μέρος του ενζύμου στην κατάσταση EI. 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 [24].

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. [10]

Οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα και υποστρώματος έχουν σκοπό τη διάκριση μεταξύ συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής αναστολής. Στην συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από την σχέση

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας η ταχύτητα μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η

αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Ωστόσο, η φαινομενική τιμή της K_m μεταβάλλεται και ονομάζεται $K_{m_{app}}$

$$K_{m_{app}} = K_m(1 + [I]/K_i) \text{ όπου}$$

$[I]$ η συγκέντρωση του αναστολέα

K_i Η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα

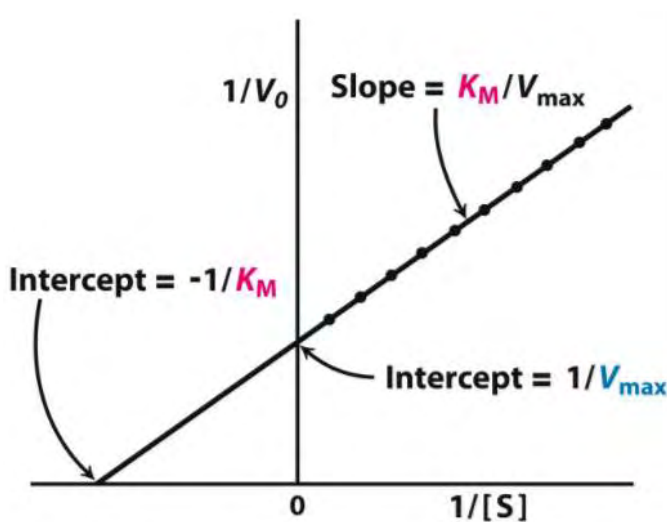
Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$ αυξάνεται και η τιμή $K_{m_{app}}$. Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Ωστόσο το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που ονομάζεται $V_{max_{app}}$ ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_m . Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει την συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιωμένο διάλυμα του ενζύμου. [10]

Επειδή η K_m είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος σε $V_{max}/2$ είναι αδύνατο να προσδιοριστεί με ακρίβεια η τιμή της K_m . Εντούτοις, η V_{max} μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια εάν η εξίσωση Michaelis - Menten μετασχηματιστεί ώστε να δίνει διάγραμμα ευθείας γραμμής. Λαμβάνοντας το αντίστροφο και των δύο πλευρών η εξίσωση $V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$ δίνει

$$1/V_0 = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \times 1/[S] \quad (1)$$

Ένα διάγραμμα του $1/V_0$ έναντι του $1/[S]$ που καλείται διάγραμμα Lineweaver-Burk ή διπλού αντιστρόφου, παράγει μια ευθεία γραμμή με τεταγμένη επί την αρχή $1/V_{max}$ και κλίση K_m/V_{max} . Η τεταγμένη επί την αρχή είναι $-1/K_m$.



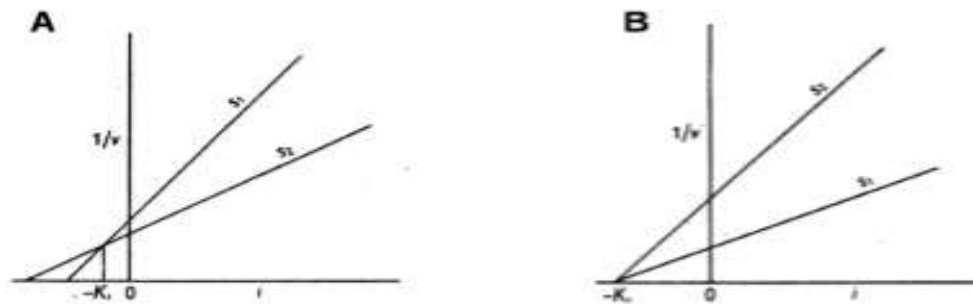
Εικόνα 1.12: Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου. Το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής κινητικής παράγεται αν παραστήσουμε γραφικά το

$1/V_0$ ως συνάρτηση του $1/[S]$. Η κλίση είναι K_M/V_{max} , η τεταγμένη επί την αρχή είναι $1/V_{max}$ και η τετμημένη επί την αρχή είναι $-1/K_M$.

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:

$$v = V_{max}[S] / (K_M(1 + [i]/K_i) + [S]) \quad (A)$$

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. 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 με το σημείο τομής στον άξονα των τετμημένων να προσδιορίζει την τιμή $-K_i$.



Εικόνα 1.13: Α) Προσδιορισμός της K_i σε συναγωνιστική αναστολή, Β) Προσδιορισμός τη K_i σε μη-συναγωνιστική αναστολή.

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

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

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:

$$K_M/[S_1] + 1 + K_M/[S_1] \cdot [i]/K_i = K_M/[S_2] + 1 + K_M/[S_2] \cdot [i]/K_i, \quad \text{ή}$$

$$1/[S_1](1 + [i]/K_i) = 1/[S_2](1 + [i]/K_i) \quad (\Gamma)$$

Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν $[S1] = [S2]$ 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, 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:

$$1/v = 1/V_{max} (1 + K_m/[S])(1 + [i] K_i) \quad [25].$$

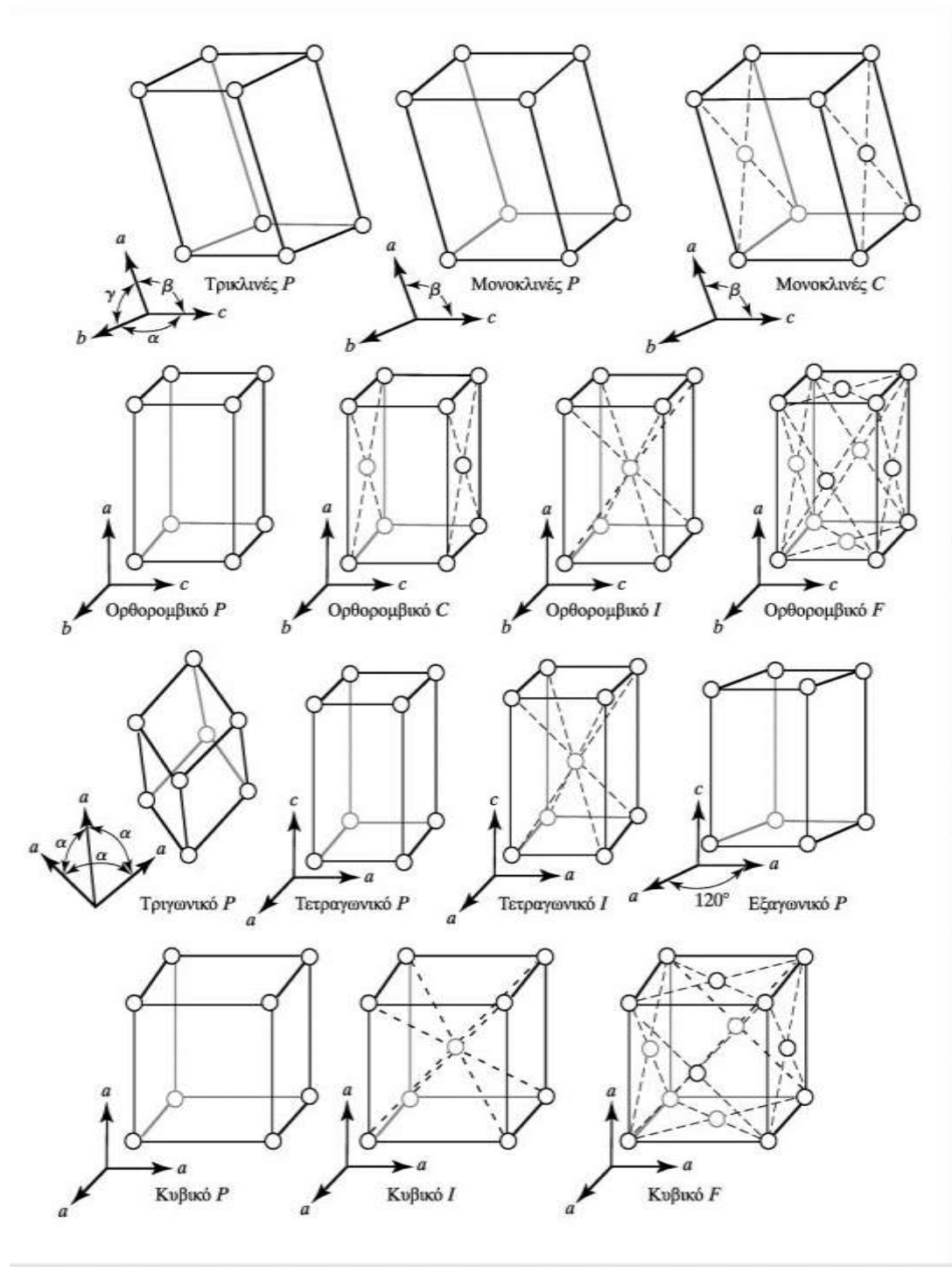
1.8 Κρυσταλλογραφία

1.8.1 Τι είναι κρύσταλλος;

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Τα μόρια σε ένα κρύσταλλο τοποθετούνται με τάξη, δηλαδή κανονικά, συμμετρικά και επαναλαμβανόμενα. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα. Κατά συνέπεια ένας κρύσταλλος μπορεί να παραχθεί από ένα μόριο, επαναλαμβάνοντας την εφαρμογή ενός συνόλου πράξεων (ή τελεστών) συμμετρίας (μετατόπισης ή στροφής). Κατά συνέπεια στην περιγραφή ενός κρυστάλλου χρειάζεται να περιγραφεί μόνο η λιγότερο συμμετρική μονάδα καθώς και η συμμετρία που μας δίνει ένα κρύσταλλο. Σε ένα κρύσταλλο, η μοριακή οντότητα που αντιστοιχεί στο επίπεδο χωρίς καμία συμμετρία, καλείται ασύμμετρη μονάδα. Αρχίζοντας από την ασύμμετρη μονάδα μπορούν να εφαρμοστούν πράξεις περιστροφής και ελικώσεων (δηλαδή μετατόπισης και στροφής), για να κατασκευαστεί το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος. Το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος μετατοπίζεται και προς τις τρεις διαστάσεις, σχηματίζοντας μια κανονική και επαναλαμβανόμενη διάταξη, που αποκαλείται κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους για να αποτελέσουν τις κορυφές τρισδιάστατων κουτιών, τα οποία είναι οι μοναδιαίες ή στοιχειώδεις κυψελίδες. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων a, b και c , με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να απεικονίζονται στα αντίστοιχα μήκη τους a, b και c . Η σχέση μεταξύ των μηκών a, b , και c και των γωνιών μεταξύ των αξόνων καθορίζουν μοναδικά τη μορφή και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας.

Ένας κρύσταλλος είναι μια επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη (χωρίς κενά) των μοναδιαίων κυψελίδων, που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Ένας κρύσταλλος κατασκευάζεται με τη μετατόπιση των μοναδιαίων

κυψελίδων σε τρεις διαστάσεις, ώστε να γεμίσει ένας όγκος. Η μοναδιαία κυψελίδα κατασκευάζεται με τη μετατόπιση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου (τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος) και το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος παράγεται με την εφαρμογή των πράξεων συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα. Η μορφολογία ενός κρυστάλλου καθορίζεται από το μέγεθος και τη μορφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας (τα μήκη του a , του b και του c και τις γωνίες του) καθώς και από τη συμμετρία του μοτίβου. Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την κατασκευή 14 μοναδικών κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά είναι τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais. Ο συνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας μαζί με τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις πιθανές μορφολογίες των κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών ομάδων χώρου, όπου κάθε ομάδα χώρου καθορίζει μοναδικά τον αριθμό των ασύμμετρων μονάδων, που συναποτελούν τη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου [26].



Τα 14 δικτυωτά πλέγματα Bravais στην κρυσταλλογραφία

1.8.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό και τα μακρομόρια συνήθως υπάρχουν σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια για τη δημιουργία ενός κρυστάλλου πρέπει τα διαλελυμένα μόρια να οδηγηθούν εκτός διαλύματος ή να κατακρημνιστούν με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη. Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα S^0 (στην πραγματικά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες,

συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη). Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού στην υπέρκορη κατάσταση. Η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρους του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος.

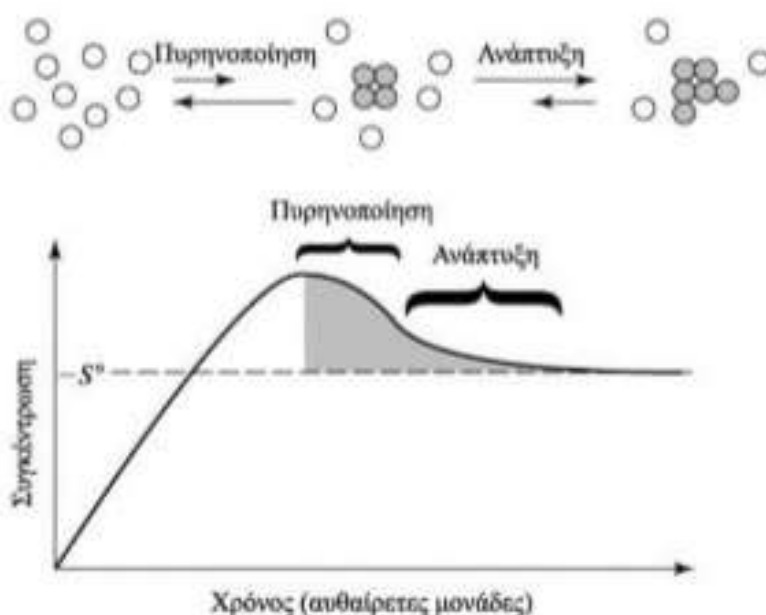
Μια δεύτερη στρατηγική για την κατακρήμνιση ενός μορίου είναι να μειωθεί η εγγενής του διαλυτότητα S^0 για μια σταθερή συγκέντρωση του υλικού, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία ή την τροποποιώντας το διαλύτη (με αύξηση ή μείωση της ιοντικής ισχύς του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολυηλεκτρολυτών όπως πολυπεπίδια ή πολυνουκλεοτίδια εμπίπτει σε μια συγκεκριμένη περιοχή των συγκεντρώσεων αλάτων. Εάν η ιοντική ισχύς του διαλύματος αυξηθεί πέραν αυτής της περιοχής με την προσθήκη άλατος ή με εξάτμιση, ή μειωθεί κάτω από αυτήν με διαπίδυση, η εγγενής διαλυτότητα θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνιστεί. Αυτές είναι οι τυπικές διαδικασίες εναλάτωσης (salting in) και εξαλάτωσης (salting out) που χρησιμοποιούνται σε πολλές τεχνικές καθαρισμού μορίων.

Υπάρχουν διάφοροι σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση ενός μορίου. Ο σημαντικότερος είναι η καθαρότητα του δείγματος. Ένα δείγμα θεωρείται ως βιοχημικά καθαρό, όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Αυτή είναι η ιδανική κατάσταση και γενικά δεν επιτυγχάνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα μακρομόριο πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να κρυσταλλωθεί. Ακόμη και ένα χημικά καθαρό δείγμα μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό διαμορφώσεων. Έτσι, τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται ώστε να διαμορφώσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτεί την εύρεση συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια, ενώ παραμένει δύσκολος ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων συνθηκών κρυστάλλωσης ακόμα και αν είναι γνωστές οι συνθήκες υπό τις οποίες ένα μακρομόριο έχει μια σταθερή στερεοδομή και είναι αδιάλυτο. Για αυτό το λόγο η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα εμπειρικών δοκιμών, που το μόριο τοποθετείται σε πλήθος διαφορετικών συνθηκών διαλύματος με στόχο την ανάπτυξη κρυστάλλου.

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου συμβαίνει σε δύο διακριτά βήματα:

- 1) ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρήνωση
- 2) ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου.

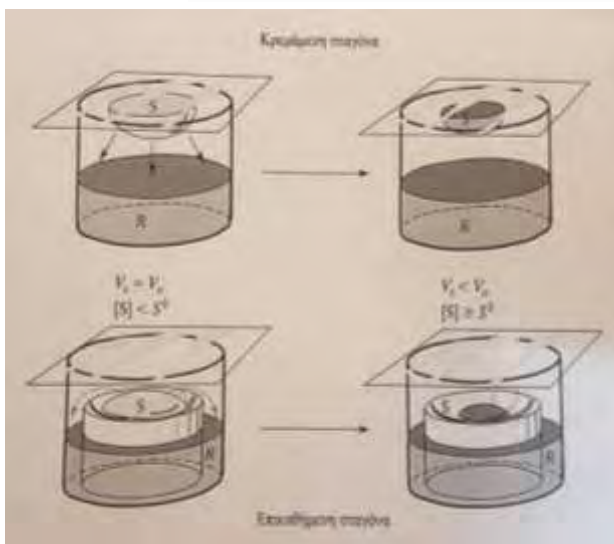


Εικόνα 1.14: Ο μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός κρυστάλλων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητας βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκέντρωση κοντά στην εγγενή διαλυτότητα S^0 .

Το στάδιο πυρήνωσης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη η οποία προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από της εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμός). 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 πυρήνωση είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα, Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δε σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν γρήγορα τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μία ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούτως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παρέχουν υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης ακτίνων X. Άρα το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο τρόπο [26].

1.8.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να διευκολύνουν τη διαδικασία κρυστάλλωσης μακρομορίων. Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες στρατηγικές είναι η διάχυση ατμών και η μικροδιαπίδυση. Και οι δύο έχουν ως σκοπό τα τροποποίηση του περιβάλλοντος του διαλύματος, μειώνοντας έτσι την διαλυτότητα ενός μακρομορίου με έναν ελεγχόμενο τρόπο. Και στις 2 περιπτώσεις, το μόριο διαλύεται αρχικά σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, που συνήθως περιέχει ένα μίγμα διαλυτών και αλάτων. Αυτό το διάλυμα του δείγματος είναι φυσικά διαχωρισμένο από ένα μεγαλύτερο όγκο του διαλύτη που τοποθετείται εντός της αποκαλούμενης δεξαμενής. Τα διαλύματα του δείγματος και της δεξαμενής τοποθετούνται σε ένα κλειστό σύστημα και προκειμένου να καταστούν τα μακρομόρια λιγότερο διαλυτά, αφαιρούνται από το διάλυμα του δείγματος (ή μερικές φορές προστίθενται) διαλύτης ή άλατα. Στη μέθοδο διάχυσης ατμών οι διαλύτες μεταφέρονται λόγω διαφοράς τάσης ατμών μεταξύ του δείγματος και της δεξαμενής. Σε αυτό το σύστημα, το ύδωρ εγκαταλείπει το δείγμα μέχρις ότου η τάση ατμών του ύδατος στο δείγμα και στη δεξαμενή να έχουν εξισορροπηθεί. Οι δύο περισσότερο κοινές τεχνικές διάχυσης ατμών είναι η τεχνική κρεμάμενης σταγόνας, όπου το δείγμα κρέμεται επάνω από τη δεξαμενή και η τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας όπου το δείγμα τοποθετείται σε μια κοιλότητα στο χώρο της δεξαμενής. Στη μέθοδο μικροδιαπίδυσης, διαλύτης μεταφέρεται με την εξισορρόπηση των οσμωτικών πιέσεων του δείγματος και της δεξαμενής διαμέσου μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης.



Εικόνα 1.15: Κρυστάλλωση με τη μέθοδο της διάχυσης των ατμών. Στην τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, το διάλυμα του δείγματος κρέμεται επάνω από μια δεξαμενή R, η οποία περιέχει υψηλή συγκέντρωση ενός κατακρημνιστή. Η χαμηλότερη πίεση ατμών της δεξαμενής ωθεί μόρια νερού σε εξάτμιση από το διάλυμα του δείγματος S, για να μειώσει τον όγκο του δείγματος V_s κάτω από την αρχική τιμή του V_0 . Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης $[S]$ των μορίων του δείγματος στο διάλυμα επάνω από την εγγενή διαλυτότητα S^0 του μορίου, με αποτέλεσμα την κατακρήμνιση ή την κρυστάλλωση. Στην τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας, η μόνη διαφοροποίηση έγκειται στο ότι το διάλυμα του δείγματος τοποθετείται σε μια κοιλότητα αντί να κρέμεται[26].

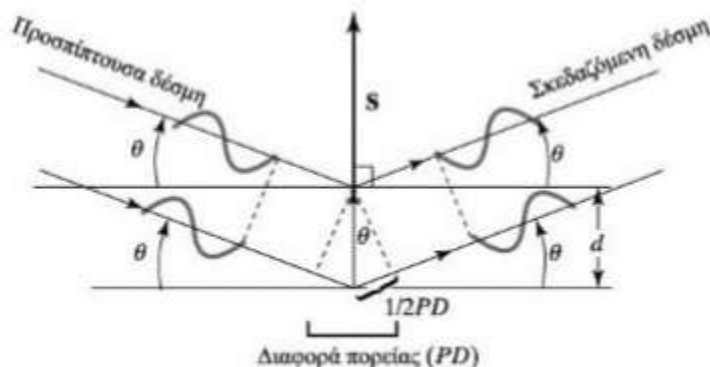
1.8.4 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων X

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-X είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση ομοιοπολικού 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. Το φαινόμενο της περίθλασης των ακτίνων-X, απαιτεί την παραδοχή της κυματικής φύσης της ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολίας. Οι γενικές θεωρίες και οι συνέπειες της περίθλασης ισχύουν για ακτινοβολίες οποιασδήποτε ενέργειας. Η εφαρμογή της περίθλασης στο ορατό φως χρησιμοποιείται συχνά για να επεξηγηθούν οι αρχές που διέπουν την περίθλαση των ακτίνων-X από ένα κρύσταλλο. 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 ανεμπόδιο 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 επαπτόμενες 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 [26].

1.8.5 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 βρίσκονται σε οικογένειες παράλληλων επιπέδων. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις

d(εικόνα 10). Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων-X (με μήκος κύματος λ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία θ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδαρίζει το κύμα υπό την ίδια γωνία [26].



Εικόνα 1.16: Ο νόμος του Bragg για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων-X 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. [26].

Η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του d , ώστε οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός 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-X .

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

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

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3) \quad \eta \quad 2 \sin \theta / \lambda = n/d \quad (4)$$

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 σκεδαστών, η μόνη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί μια ανάκλαση, είναι να ικανοποιείται ο νόμος

του Bragg. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εκμηδενίζεται. 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 [26].

1.8.6 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, είναι δυνατή η βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε να προσαρμοστεί οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Υπάρχει όμως ένα πρόβλημα με τους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονιακής 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. Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R (ή παράγοντας R):

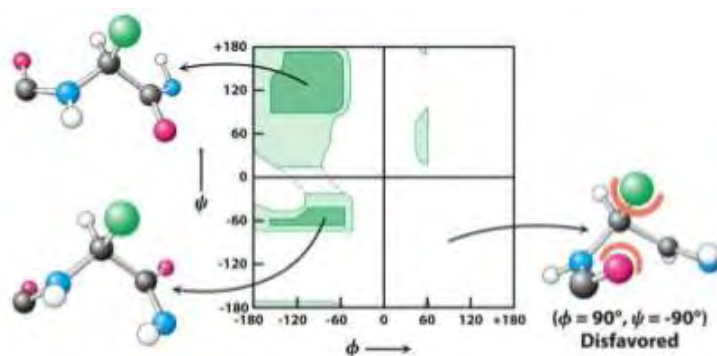
$$R = \frac{\sum |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

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. Είναι διαθέσιμα διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκύπτοντων μοντέλων. Πρόσφατα, 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 μειώνουν 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) [21].

1.8.7 Διάγραμμα Ramachandran

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, απαιτείται έλεγχός του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. 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 [26].



Εικόνα 1.17 : 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 [26]

1.8.8. Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X αποκαλύπτει την τρισδιάστατη δομή σε ατομικό επίπεδο

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X παρέχει πληροφορίες για την πρωτεϊνική δομή με τη μεγαλύτερη δυνατή ευκρίνεια. Με την τεχνική αυτή αποκαλύπτεται η λεπτομερής τοποθέτηση των περισσότερων ατόμων του πρωτεϊνικού μορίου στον χώρο. Η χρήση των ακτίνων X δίνει την καλύτερη ευκρίνεια διότι το μήκος κύματος των ακτίνων βρίσκεται περίπου στο επίπεδο του μήκους κύματος του ομοιοπολικού δεσμού. Τα τρία βασικά συστατικά της ανάλυσης με ακτίνες X είναι: ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος, μια πηγή ακτίνων X και ένας ανιχνευτής. Η τεχνική απαιτεί όλα τα μόρια της πρωτεΐνης να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και για αυτό το πρώτο στάδιο της έγκειται στην επιτυχή κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια απαιτείται μια πηγή ακτίνων X. Η δέσμη ακτίνων X μήκους κύματος 1,54 Å παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς ένα στόχο χαλκού. Μια στενή δέσμη ακτίνων X προσκρούει στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο. Μέρος της περνά τον κρύσταλλο, ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς διάφορες κατευθύνσεις. Τελικά, η δέσμη που σκεδάζεται, ή περιθλάται, μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ ακτίνων X, του οποίου το μαύρισμα είναι ανάλογο της έντασης των ακτίνων X, ή από ένα ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης. Ο τρόπος σκέδασης προσφέρει πολλές πληροφορίες για τη δομή της πρωτεΐνης.

Ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ένα τριχοειδή σωλήνα και παίρνει ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό σε σχέση με τις ακτίνες X και τα φιλμ. Ο κρύσταλλος περιστρέφεται έτσι ώστε η δέσμη ακτίνων X να προσκρούει σε πολλά σημεία του κρυστάλλου. Η μεταπτωτική αυτή κίνηση του κρυστάλλου έχει ως αποτέλεσμα μία φωτογραφία με ακτίνες X που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες σειρές σημείων που λέγονται ανακλάσεις. Η ένταση κάθε σημείου μπορεί να μετρηθεί. Αυτές οι εντάσεις και οι θέσεις τους είναι τα βασικά πειραματικά δεδομένα μιας κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες X. Το επόμενο βήμα είναι η ανασύνθεση της εικόνας της πρωτεΐνης από τις παρατηρούμενες εντάσεις. Η εικόνα σχηματίζεται μετά από μια μαθηματική ανάλυση που λέγεται μετασχηματισμός Fourier. Επομένως τώρα μπορούν να γίνουν οι υπολογισμοί ενός χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων, που δίνει την πυκνότητα των ηλεκτρονίων για έναν μεγάλο αριθμό σημείων σε τακτές αποστάσεις στον κρύσταλλο. Αυτή η τρισδιάστατη κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας αντιπροσωπεύεται από μια σειρά παράλληλων τομών που τοποθετούνται η μία πάνω στην άλλη. Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση του χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων. Ένας βασικός παράγοντας είναι η διακριτική ικανότητα των ακτίνων X που καθορίζεται από τον αριθμό των περιθλώμενων εντάσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση Fourier. Η απόλυτη αναλυτική ικανότητα μιας ανάλυσης με ακτίνες X καθορίζεται από τον βαθμό τελειότητας ενός κρυστάλλου. Για τις πρωτεΐνες το όριο ανάλυσης συνήθως είναι περίπου 2 Å [26].

IV. Σκοπός

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ενζύμο και το σχεδιασμό ενδυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \Leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη του αναστολέα 6072 για τον προσδιορισμό της K_i έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου και της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου και στη συνέχεια προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP , όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

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)	Sigma
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
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	Applichem
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	Applichem
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 ₂ HPO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck

2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (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 συμπύκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10000 cut-off	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
Πλασμίδια	Εταιρεία
hIGP	Eurofin

2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

Στήλες συγγένεια	Εταιρεία
HiTrap TALON crude	GE Healthcare
His-Trap (Ni ²⁺ Sepharose) υψηλής απόδοσης (HP)	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:

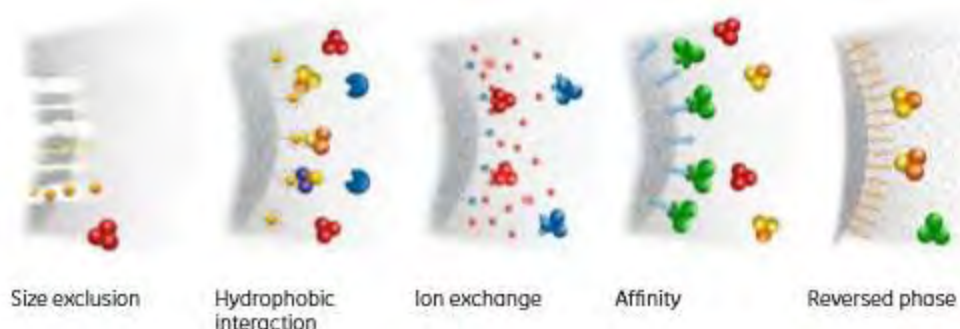
1. η ηλεκτροδιάτρηση,
2. η βαλλιστική μέθοδος,
3. ο μετασχηματισμός με υπερήχους και
4. ο χημικός μετασχηματισμός.

Χημικός μετασχηματισμός: Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι χημικού μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων, με το CaCl₂ και ηPEG (πολυαιθυλική γλυκόλη) να αποτελούν τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Στον χημικό μετασχηματισμό με CaCl₂ τα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα με CaCl₂, επωάζονται με το πλασμίδιο σε θερμοκρασία 0 °C και στη συνέχεια για μικρή διάρκεια σε θερμοκρασία 42 °C (θερμικό σοκ). Το θερμικό αυτό σοκ προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης των δεκτικών κυττάρων που έχουν επεξεργαστεί με CaCl₂, ώστε το πλασμίδιο να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Στη συνέχεια η μεταφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία 4 °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 [27].

2.6 Υγρή χρωματογραφία – Σύστημα FPLC

Ο όρος χρωματογραφία, που προέρχεται από τις λέξεις «χρώμα» και «γράφειν», αναπτύχθηκε αρχικά από τον MikhailTswett 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 για τον διαχωρισμό μιγμάτων στα συστατικά τους αλλά και για την ταυτοποίηση των συστατικών που τα αποτελούν. Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HighPerformanceLiquidChromatography, HPLC), είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί υψηλή πίεση, συνήθως με οργανικούς διαλύτες και στήλες με μικρή διάμετρο, περίπου 540 nm, για την επεξεργασία δειγμάτων με μικρό όγκο. [28]



Εικόνα 2.1 Τα κυριότερα είδη της ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών [29].

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 (*flowthrough*). 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. 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:

1. **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.

2.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 απομακρύνονται από τη στήλη με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του UV (Flowthrough).

3.Έκπλυση: Όταν εισαχθεί όλο το δείγμα, τότε γίνεται εκπλύσιμο της στήλης με το διάλυμα έκπλυσης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά προσδεμένες πρωτεΐνες και να μείνει μόνο η πρωτεΐνη/ες που εμφανίζει/ζουν 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 έκπλυση της στήλης γίνεται συνήθως με 10 όγκους στήλης από το διάλυμα έκπλυσης.

4. Έκλουση: Αφού λοιπόν η απορρόφηση μείνει σταθερή για κάποιους όγκους στήλης, τότε εφαρμόζουμε το διάλυμα έκλουσης. Η έκλουση μπορεί να γίνει είτε με εφαρμογή 100 % του διαλύματος έκλουσης, 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.

5. Το υλικό της στήλης επανα-εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης για επόμενη χρήση, είτε καθαρίζεται με αιθανόλη και αποθηκεύεται.

2.6.1.1 Στήλη με ακινητοποιημένα Ni²⁺

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 διαφορική συγγένεια των πρωτεϊνών για τα ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα προέρχεται από τους δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ των εμπλεκόμενων μεταλλικών ιόντων και των ομάδων δότες ηλεκτρονίων που υπάρχουν σε μερικά κατάλοιπα αμινοξέων (π.χ., His, Cys, Trp και Arg). Στο IMAC, αυτές οι ομάδες δότη ηλεκτρονίων σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων όπως Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, or Ni²⁺ τα οποία τυπικά είναι ακινητοποιημένα σε πολυμερή με ομάδες που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως ιμινοδιοξικό οξύ (IDA) ή νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA). Η

συγκράτηση πρωτεϊνών επί των σφαιριδίων IMAC επηρεάζεται από την φύση των χηλικών ομάδων, από το μεταλλικό ιόν και από την συγκέντρωση άλατος και του pH. Κάθε χηλική ομάδα παρουσιάζει τη δική της ικανότητα εκλεκτικότητας και προσρόφησης προς μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η ιστιδίνη επιδεικνύει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με ακινητοποιημένα χηλικά χημικά μεταλλικά ιόντα, ως αποτέλεσμα η ετικέτα ολιγοϊστιδίνης His6 είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ετικέτες για τον καθαρισμό πρωτεΐνης. Το Ni(II)-nitrilotriaceticacid (Ni-NTA) παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για γειτονικά κατάλοιπα ιστιδίνης και είναι μία από τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μήτρες IMAC για την δέσμευση της πρωτεΐνης-στόχου [30].

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[31].

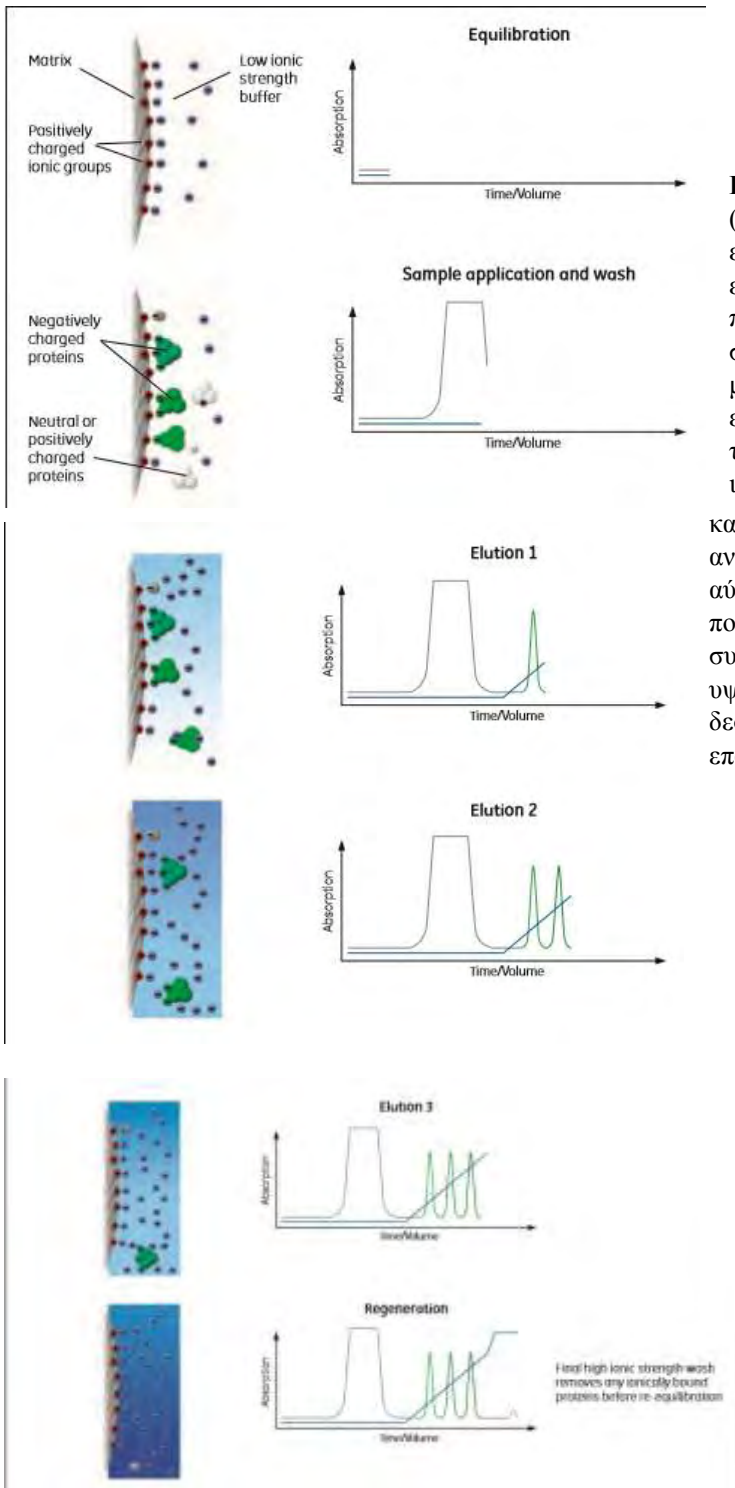
2.7 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής - Ionexchangechromatography (IEX)

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 IEX εισήχθη στη δεκαετία του 1960 και εξακολουθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό και τον καθαρισμό βιομορίων. Σήμερα, η IEX είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων και άλλων φορτισμένων βιομορίων, προσφέροντας διαχωρισμούς υψηλής ανάλυσης. Η τεχνική είναι ικανή να διαχωρίζει μοριακά είδη που έχουν μόνο μικρές διαφορές στις ιδιότητες του φορτίου τους, για παράδειγμα δύο πρωτεΐνες που διαφέρουν κατά ένα φορτισμένο αμινοξύ. καθώς 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 (κατιοανταλλάκτες).

Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής μπορεί να περιγραφεί με τα εξής βήματα:

1. Το πρώτο βήμα είναι η **εξισορρόπηση** της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες. Όταν επιτυγχάνεται ισορροπία, 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 επιλέγονται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι, όταν το δείγμα φορτώνεται, δεσμεύονται στην στήλη οι πρωτεΐνες-στόχος και απομακρύνονται όσο το δυνατόν οι ανεπιθύμητες.
2. Το δεύτερο βήμα είναι η **εφαρμογή του δείγματος και η έκπλυση**. Ο στόχος σε αυτό το βήμα είναι να δεσμευτεί/τούν στην στήλη η/οι πρωτεΐνη/νες στόχος και να απομακρυνθούν με έκπλυση της στήλης όλες οι προσμίξεις που δεν συνδέονται σε αυτή. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και ιοντική ισχύ με το αρχικό διάλυμα ώστε να δεσμεύει όλες τις φορτισμένες πρωτεΐνες-στόχο.
3. **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. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα άλατος (τυπικά 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 το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο επιλεγμένο pH θα είναι οι πρώτες που εκλύονται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο σε ένα ορισμένο pH θα συγκρατηθούν πολύ και θα εκλουστούν στο τέλος. Όσο υψηλότερο είναι το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ισχύς που απαιτείται για την έκλυση.
4. **Αναγέννηση** Μια τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος αναγεννά τη στήλη και απομακρύνει τα μόρια που εξακολουθούν να συνδέονται. 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.



Εικόνα 2.3: Χρωματογραφία ανιοανταλλαγής. (Από πάνω προς τα κάτω). Η στήλη έχει εξισορροπηθεί με το αρχικό διάλυμα (διάλυμα εξισορρόπησης). Αντίθετα φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται σε ιοντικές ομάδες της στήλης. Οι μη φορτισμένες πρωτεΐνες ή εκείνες με το ίδιο φορτίο εκλύονται κατά την εφαρμογή του δείγματος ή αμέσως μετά, κατά τη διάρκεια της έκπλυσης. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος εκλύει δεσμευμένες πρωτεΐνες καθώς τα ιόντα στο ρυθμιστικό περιβάλλον ανταγωνίζονται για θέσεις πρόσδεσης. Περαιτέρω αύξηση στην ιοντική ισχύ εκτοπίζουν πρωτεΐνες που είναι περισσότερο φορτισμένες (πιο στενά συνδεδεμένες). Η τελική έκπλυση της στήλης με υψηλή ιοντική ισχύ αφαιρεί οποιεσδήποτε ιοντικά δεσμευμένες πρωτεΐνες πριν από την επανεξισορρόπηση.

2.7.1 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) [35].

2.8 Αφαίρεση της ετικέτας ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών

Οι ετικέτες συγγένειας έχουν καταστεί βασικά εργαλεία για την παραγωγή ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών. Όχι μόνο διευκολύνουν την ανίχνευση και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, όπως είχαν αρχικά προβλεφθεί, αλλά μπορούν επίσης να έχουν επωφελή επίδραση στην απόδοση των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να αυξήσουν τη διαλυτότητά τους και ακόμη και να προωθήσουν την ορθή τους αναδίπλωση.

Έχουν σχεδιαστεί πολλές μέθοδοι για την απομάκρυνση τους από τις ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούν ανασυνδυσμένες 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[36].

2.8.1 Πρωτεάση TEV

Η πρωτεάση TEV, ανακαλύφθηκε στα τέλη της του 80, 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.

2.9 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb)

Τροποποίηση της μεθόδου Fisher&Krebs (*MethinEnzymologyVolV, p. 369-373, 1962*). Αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

Ημέρα 1^η

ΥΛΙΚΑ

- 3 αρσενικοί κόνικλοι (μέτριου μεγέθους), ποικιλία *oryctolaguscuniculus*
- Μαχαίρι *
- Ξύλινη βάση *
- Δοχεία 20 Lt (κουβάδες)

- Γάζα
- Υαλοβάμβακας
- Μεγάλα σωληνάριαφυγοκέντρησης*
- Αντλία κενού
- Χάρτινα φίλτρα
- Ογκομετρικός κύλινδρος 2 L
- Πάγος
- CH₃COOH 1 N
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα 90 % w/v (NH₄)₂SO₄

*Τοποθέτηση των υλικών αυτών στον ψυκτικό θάλαμο την προηγούμενη της έναρξης της διαδικασίας απομόνωσης του ενζύμου.

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος.

1. ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από τους 3 αρσενικούς κόνικλους και τοποθετείται αμέσως σε πάγο.
2. Ο μυϊκός ιστός ομογενοποιείται σε κρεατομηχανή, ζυγίζεται και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού.
3. Ο κιμάς εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δεν ξεπέρασε τα 30 min.

Εκχύλιση 1^η (10 min) 2300 mL

- a) Κιμάς + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί **8 min**
- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 2^η (10 min) 2300 mL

- a) Κιμάς από την 1^η εκχύλιση + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί **8 min**
- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 3^η (10 min)1150 mL

- a) Κιμάς από την 2^η εκχύλιση + **μίσος** όγκος απιονισμένου ύδατος επί **8 min**

- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
 - c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ
4. Το εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

5. Ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2 με προσθήκη 1 N CH_3COOH υπό ελαφρά ανάδευση (το εκχύλισμα δεν χρειάζεται να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών.
6. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 min.
7. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 rcf επί 30 min.
(Η φυγοκέντρηση γίνεται με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής της ψυχόμενης φυγοκέντρου.)
8. Διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού.
9. Ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO_3 . **ΔΕΙΓΜΑ Α**

Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (90 % w/v).

10. Απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου = 0.837 X όγκος εκχυλίσματος
11. Ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH_4OH). Ο έλεγχος του pH γίνεται με πεχαμετρικό χαρτί και η ρύθμιση στον απαγωγό.
12. Το διάλυμα του θειικού αμμωνίου προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση. **4220 mL**
13. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για 24 hrs.*
14. 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα.

*Αντί για O/N μπορούμε να αφήσουμε το δείγμα στον ψυκτικό θάλαμο για 2 μέρες ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός.

Ημέρα 2^η

Μεμβράνες διαπίδυσης

ΥΛΙΚΑ

- Μεμβράνες
- Ποτήρι ζέσεως 1L
- Na₂CO₃
- EDTA
- dH₂O

1.Κόβουμε τη μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε.

2.Ζυγίζουμε 6.5 gNa₂CO₃ και 2.44 gEDTA για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος.

3.Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται στο παραπάνω διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 min.

4.Στην συνέχεια τα σακουλάκια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο H₂O.

5.Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται σε απιονισμένο H₂O και αφήνονται να βράσουν για 30 min.

6. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C

ΥΛΙΚΑ

- Αντλία κενού
- Μεγάλα tubes φυγοκέντρησης
- Σακουλάκια διαπίδυσης
- Διάλυμα Tris 2M (20 mLχωρίς ρύθμιση pH)

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο έχουν σχηματιστεί 2 φάσεις: υπερκείμενο-ίζημα.

1. Ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου διαλύματος αποχύνεται με τη χρήση αντλίας.

2. Το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5.110 rcf επί 40 min με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής.

3. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 λίτρων.

10 mL διαλύματος Tris 2 M αραιώνονται με απιονισμένο ύδωρ σε όγκο 400 mL (συγκέντρωση περίπου 50 mM). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στη τιμή 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N HCl. Το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 L με τη χρησιμοποίηση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί.

5. Τα σακουλάκια διαπίδυσης πλένονται με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος στο οποίο φυλάσσονται.

6. Το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετείται σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα.

ΔΕΙΓΜΑ Β (πριν το dialysis).

Ημέρα 3^η

ΥΛΙΚΑ

- Μικρά σωληνάρια φυγοκέντρωσης
- Υδατόλουτρο στους 37 °C
- Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 ($\rho=1.114$ gr/mL, M.W.=78.3). Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχαμετρικό χαρτί.
- Διάλυμα EDTA 0.1 M, pH 7.0. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα CH₃COOH 1 N
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

1. Συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά τη διαπίδυση σε ογκομετρικό κύλινδρο.

2. Διαύγαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με φυγοκέντρωση στις 34.540 rpm για 15 min (0 – 4 °C) με χρήση της μικρής κεφαλής.

3. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου υγρού. (ΔΕΙΓΜΑ Γ)

4. Προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης = πρωτεϊνικός όγκος X 3/27= 13.1 mL

$$118\text{mL} + 13.1\text{ mL} = 131.1\text{ mL}$$

5. Προσθήκη διαλύματος EDTA 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος EDTA 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης X 5/1000 = 131.1 mL X 5/1000= 0,656 mL ή 656 μL

6. Προσθήκη διαλύματος 2 M Tris ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση και το pH μετράται με πεχάμετρο.

7. Επώαση του μίγματος στους 37 °C επί 1 hr με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. (ήπια ανάδευση ανακίνηση και όχι με ράβδο)

8. Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το pH (περίπου 10-15 min) ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος CH₃COOH 1 N.

9. Διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min(25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

10. Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση ογκομετρείται. (ΔΕΙΓΜΑ Δ)

11. Προθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3 mL

12. Προσθήκη διαλύματος (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3 mL

13. Το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί. (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 h)

Ημέρα 4^η

ΥΛΙΚΑ

- Μικρά tubes φυγοκέντρησης

- Υδατόλουτρο στους 30°C
- Ρυθμιστικό διάλυμα β -GP(β -glycerophosphate)/2-μερκαπτοαιθανόλης/EDTA 50:50:1 pH 6.8. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο.
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0

1. Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 min με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

2. Η θερμοκρασία της φυγοκέντρου επαναφέρεται στους 25-30 °C

3. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου.

4. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

5. Το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται

6. Προσθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 1.3\text{mL}$$

7. Προσθήκη διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg, pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 1.3\text{mL}$$

8. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρωσης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 hrs.

(1^η ανακρυστάλλωση) (ΔΕΙΓΜΑ Ε)

Η παραπάνω διαδικασία (1^η ανακρυστάλλωση) επαναλαμβάνεται ακριβώς με ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 ώρες και έτσι λαμβάνει χώρα η 2^η ανακρυστάλλωση και το μίγμα αφήνεται για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο.

Ημέρα 5^η

ΥΛΙΚΑ

- Μικρά σωληνάρια φυγοκέντρωσης
- Υδατόλουτρο στους 30°C

- Ρυθμιστικό διάλυμα β -GP(β -glycerophosphate)/2-μερκαπτοαιθανόλης/EDTA 50:50:1 pH 6.8. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο.
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0
- Γλυκερόλη 100 %

1. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1^η ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3^η ανακρυστάλλωση.

2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1^η ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς όμως την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

3. Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β ως ακολούθως:

10 μL ενζυμικού δείγματος 2500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 280nm και 260 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$(\text{OD } 280/1.32) \times (2510/10) = [\text{GPb}], \text{ mg/mL}$$

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (ϵ) για την rmGPb ισούται με 1.32.

$$C_{\text{GPb}} = 144 \text{ mg/mL}, 1,04\text{g.}$$

5. Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και φυλάσσεται στους -20°C .

2.10 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του. Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για περίπου 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260nm και 280nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι <0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (*T state*) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al., 1985]. Η μέθοδος *batch* αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (*T state*), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P4₃2₁2) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-
2. Αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
3. Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
4. Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
5. Διάλυμα IMP 100mM, pH 6.7
6. Πυρήνες κρυστάλλωσης
7. Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
8. Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3nm, μήκους 3 cm.

ΟΡΓΑΝΑ:

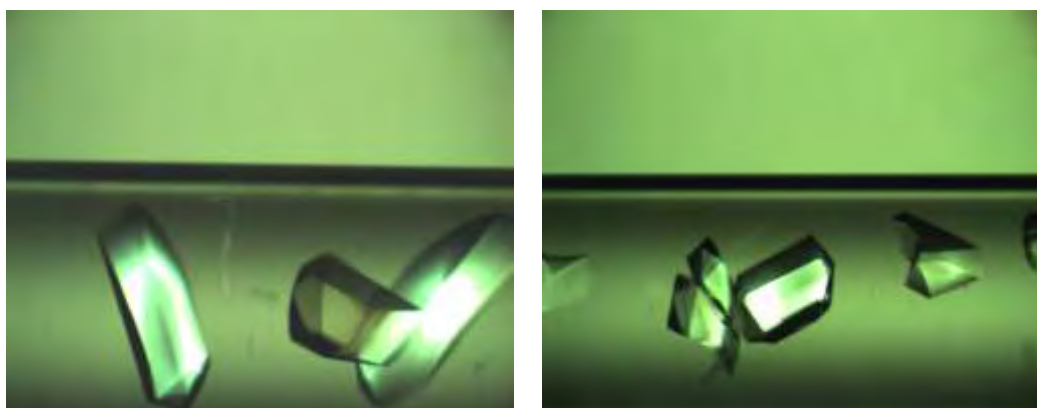
Φασματοφωτόμετρο UV

ΠΟΡΕΙΑ:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P4₃2₁2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53$). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/mL καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσεως [Oikonomakos *et al.*, 1985]. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h στους 16°C, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών-X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση

2.11 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 διατρέξει το πήκτωμα και θα διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό του βάρος.

Κάποιες από τις υπόλοιπες μεθόδους ηλεκτροφόρησης είναι:

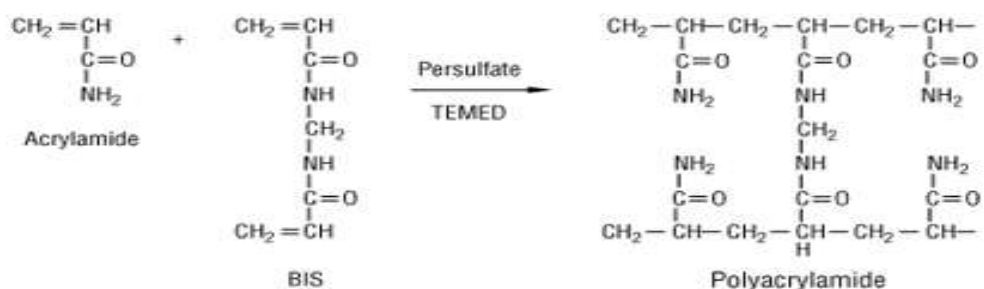
- ✓ η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D),
- ✓ ισοηλεκτρικής εστίασης και
- ✓ σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.

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 αγαρόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 kDa.

Η πολυακρυλαμίδα έχει κάποια χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, όπως:

1. Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
2. Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη.
3. Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς.
4. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται.

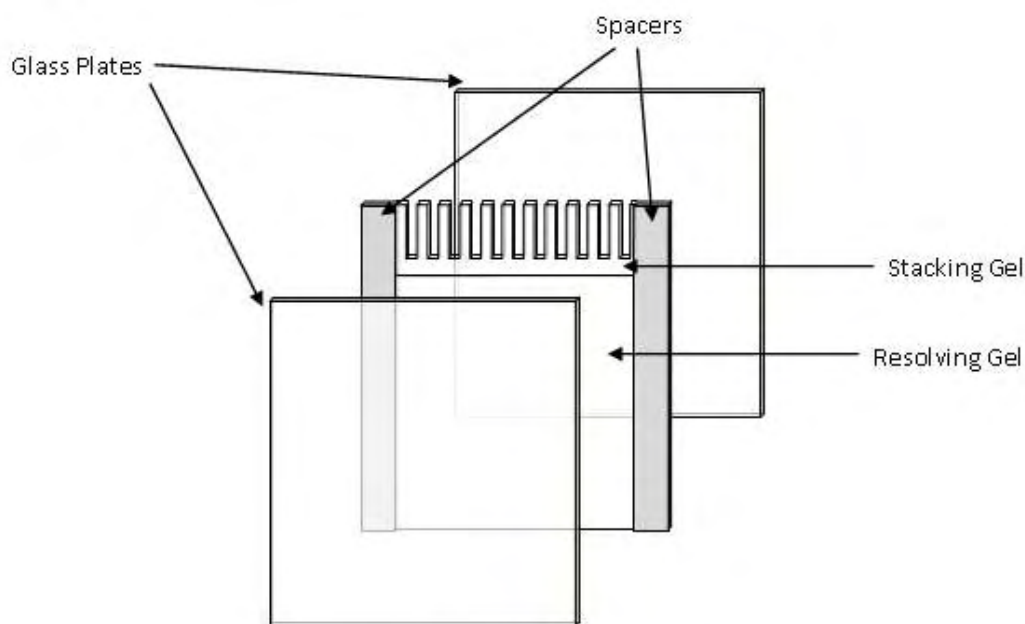
5. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδένουν χρωστικές των πρωτεϊνών.



Εικόνα 2.4. Η αντίδραση πολυμερισμού. Παρατηρούμε πως σχηματίζονται δύο γραμμικά πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή ακρυλαμιδίου και συνδέονται μεταξύ τους με bis ακρυλαμίδιο.

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 2.4**. 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 του 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 [38].

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 (Εικόνα 2.5). 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.



SDS-Page Gel Setup

Εικόνα 2.5. Κατασκευή δημιουργίας πηκτής ακρυλαμιδίου.

Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση 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 2.1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10%	12%
Συστατικά	Επιστοίβαξης (3mL)	Διαχωρισμού (5mL)	
dH2O	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 6.8	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

Πίνακας 2.1. Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου διαφορετικής πυκνότητας

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 επιστοιβάξης 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 επιστοιβάξης 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.

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 συμπίκνωση 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.

2.12 Χρώση πηκτώματος

Το πήκτωμα που λάβαμε μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε σε 10v διαλύματος 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 10v. 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 10v μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση με Coomassie Blue.

2.13 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 ώστε 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.

2.14 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής GP (hIGP)

Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PYGL*) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης pET-M11, 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. Όλες η διαδικασίες χειρισμού των 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 των 10 mL, στο οποίο προστέθηκαν 20 µg/mL καναμυκίνη, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2$) και 10 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, καθώς ρυθμίστηκε και το pH του θρεπτικού μέσου στο 7 με λίγες σταγόνες NaOH. 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 20 µg/mL καναμυκίνη, 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 ($\lambda=600$ 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 τοποθετηθήκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0.5 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 τοποθετηθήκαν σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (250 mL) σε 5000 rpm, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχτηκε το ίζημα. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM β -GP (pH 7), 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole και 1 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 εφαρμόζοντας υπερήχους σε πάγο: 30 sec εφαρμογή υπερήχων/30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση για 1h, 4 °C, σε 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 µm και

αφήσαμε το κυτταρόλυμα στον πάγο. Η απομόνωση της hIGP έγινε σε 3 βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε κατά τον καθαρισμό με το σύστημα ÄKTA-FPLC ήταν φιλτραρισμένα με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.45 μm και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

Πρώτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (HiTrap TALON crude, GE Healthcare)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM β -GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0 (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 έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιείχε 20 mM β -GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris pH 8, 1 mM DTT (διάλυμα A της Resource Q), υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C για 16 ώρες, για να απομακρυνθεί το NaCl.

Δεύτερο βήμα: Στήλη ιοντοανταλλαγής Resource Q (GE, HealthCare)

Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο pH 8 η hIGPb έχει αρνητικό φορτίο και έτσι μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως η στήλη Resource Q. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris pH 8, 1 mM DTT (διάλυμα A) 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 A 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 8, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Πιο συγκεκριμένα η έκλουση έγινε για 40 min, από 0-40 % του διαλύματος B, 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 B ώστε να απομακρυνθούν οι ισχυρά προσδεδεδεμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών και προστέθηκε πρωτεάση TEV σε αναλογία 1 mg TEV για 40 mg ολικής πρωτεΐνης

Τρίτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni²⁺ σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole (διάλυμα A) 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 A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλυση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιέχει 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και η πρωτεΐνη όπως αναμενόταν βρισκόταν στο flow through, καθώς δεν διαθέτει την His-Tag που της επιτρέπει να δεθεί στη στήλη, καθώς αυτή η ετικέτα απομακρύνθηκε με τη δράση της πρωτεάσης TEV.

Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά που περιείχαν τη hIGPb σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι cutoff 30.000 Daltons. Κάναμε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 4000g, ώστε πάνω από το φίλτρο να μείνουν περίπου 100 μL μL μL πρωτεΐνης. Τέλος, προσδιορίσαμε την ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford.

2.15 Φωσφορυλίωση της hIGPb

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

Η φωσφορυλίωση της hIGPb που απομονώθηκε έγινε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 1X HEPES, 1 mM ATP, 16 ng/mL PhK, 0.2 mg/mL hIGPb. Η PhK αραιώθηκε αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X HEPES και 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.

Όγκος φωσφορυλίωσης 200μL :

- 0,2 mg/mL hIGPb
- 1X HEPES
- 1 mM ATP (+ BSA)
- 16 ng/mL Phk

2.16 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

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 G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος [39,40].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε την gmGPb και την hGPa..

2.16.1 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 [39]. 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.

2.16.2 Ενζυμικό διάλυμα

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την rmGPb και 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την hlGPa σε όγκο 240 μL μL μL ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν 180 μL , να είχαμε 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rmGPb και 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hlGPa. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε GP, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 σε αναλογίες:

rmGPb	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10%, 24 μL	Glycogen 1%
Ρυθμιστικό διάλυμα 50/50/1 12 μL	Ρυθμιστικόδιάλυμα 2.5/2.5/0.05
rmGPb 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8,2 μL	rmGPb 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,
dH ₂ O 195,8 μL	
V_{τελ}= 240 μL	

hlGPa	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10%, 24 μL	Glycogen 1%
hlGPa 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	hlGPa 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
dH ₂ O	
V_{τελ}= 240 μL	

Αφήσαμε τα ενζυμικά διαλύματα για 15min στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.16.3 Υποστρώματα

Όπως αναφέραμε, στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε, μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή της προσθήκη της G1P 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 παρασκευάσαμε με αραιώση από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (AssayBuffer 1) που περιέχει 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Αρχικά, παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα G1P 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 μL . Από τα 400 mM παρασκευάσαμε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P 400 mM 450 μL	G1P 90 mM
dH ₂ O 200 μL	AssayBuffer2
AssayBuffer 1 1350 μL	
Vτελ= 2000 μL	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που χρησιμοποιήσαμε παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	[G1P] mM στα 180 μL της αντίδρασης
G1P 90 mM 100 μL Assay buffer 2 100 μL	G1P 45 mM Vτελ= 200 μL	10
G1P 90 mM 150 μL Assay buffer 2 350 μL	G1P 27mM Vτελ= 500 μL	6
G1P 90 mM 100 μL Assay buffer 2 400 μL	G1P 18 mM Vτελ= 500 μL	4
G1P 27 mM 100 μL Assay buffer 2 100 μL	G1P 13.5mM Vτελ= 200 μL	3
G1P 90 mM 50 μL Assay buffer 2 450 μL	G1P9mM Vτελ= 500 μL	2
G1P 9 mM 100 μL Assay buffer 2 100 μL	G1P4.5mM Vτελ= 200 μL	1

Η h1GPa είναι ενεργή και παρουσία υποστρώματος βρίσκεται στην R-στερεοδιαμόρφωση με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται κάποιον αλλοστερικό ενεργοποιητή (τροποποιητή) (AMP) για να ενεργοποιηθεί, όπως συμβαίνει με την rmGPb (αλλοστερική μετάπτωση από την T στην R). Επομένως, τα διαλύματα υποστρωμάτων περιείχαν AMP, G1P, dH₂O και DMSO ή αναστολέα για την rmGPb και G1P, dH₂O και DMSO ή αναστολέα για την h1GPa.

Υποστρώματα rmGPb

G1P (από stock mM)	40 μL (9mM)	40 μL (13.5mM)	40 μL (18mM)	40 μL (27 mM)	40 μL (45mM)
dH₂OμL	93.2 μL	93.2 μL	93.2 μL	93.2 μL	93.2 μL
Inhibitor	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL

(10% DMSO)					
AMP	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L
Vτελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Υποστρώματα hIGPa

G1P (από stock mM)	40 μ L (4.5mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18mM)	40 μ L (27mM)
dH₂O μL	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L
Inhibitor (10% DMSO)	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
Vτελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Οι αναστολείς διαλυθήκαν σε κατάλληλο όγκο DMSO ώστε να έχουν συγκέντρωση 100 mM. Έπειτα με διαδοχικές αραιώσεις (της τάξης των μ M) μειώσαμε τη συγκέντρωση του DMSO σε 10 % (v/v), ώστε στην αντίδραση να έχουμε 2 % (v/v) DMSO όπως αναλύεται παραπάνω. Η Km του ενζύμου στην περίπτωση αυτή προσδιορίστηκε παρουσία 2 % (v/v) DMSO. Για τον προσδιορισμό των Km(app.) χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, όπως και στον προσδιορισμό της Km, αλλά κάθε φορά το πείραμα έγινε παρουσία μίας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα. Ο προσδιορισμός της Ki έγινε με τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Για τον αναστολέα 6072 έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 60 μ M και έναντι της hIGPa 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 70 μ M.

2.16.4 Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της Km λάβαμε 36 μ L από το ενζυμικό διάλυμα και τα προσθέσαμε στα 144 μ L του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης ίσο με 180 μ L. Οι συγκεντρώσεις της G1P ήταν 2, 3, 4, 6, 10 mM για την rmGPb, ενώ για την hIGPa ήταν 1, 2, 3, 4, 6 mM. Στη συνέχεια του πειράματος, για την rmGPa, πήραμε 40 μ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 1, 2, 3, 4 min, και τα αποθέσαμε σε 10 μ L SDS 1 %. Κατόπιν κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.

Για την hIGPa ο χρόνοι που σταματήσαμε την αντίδραση ήταν 5, 10, 15, και 20 min.

Για τον προσδιορισμό των Km (app.) το παραπάνω πείραμα έγινε παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά. 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 H₂O	40 μL dH ₂ O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	32 μL dH ₂ O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	31.1 μL dH ₂ O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P, συνήθως 45 mM
Τυφλό φωσφορικών	30 μL dH ₂ O + 10 μL Pi 1 mM

Επομένως σε 40 μL των τυφλών είχαμε 5 $\mu\text{g/mL}$ rmGPa και hIGPa, 10 mM G1P για την rmGPb και 6 mM G1P για την hIGPa και 0.25 mM Pi. Από την απορρόφηση που πήραμε για τα 10 mM G1P, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.6.1. Μετά τα 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 700 μL διαλύματος φωτομέτρησης στη rmGPb και 500 μL διαλύματος φωτομέτρησης στη hIGPa. 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 dH₂O. 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 [39].

2.16.5 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit [41]. Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (K_m , V_{max} , K_i) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστηριότητα 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 δραστηριότητα 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 συγκέντρωση 0.25 mM, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο εδάφιο 2.6.3. 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 G1P. Έτσι, η απορρόφηση των φωσφορικών ισούταν με

$$(B - \text{Abs τυφλού ενζυμικού διαλύματος} - \text{Abs τυφλού G1P}) = \text{Abs φωσφορικών του δείγματος} = C$$

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

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

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

$$\text{limit} = 0.78 \cdot [\text{G1P}] \cdot \text{assay volume}$$

0.78 είναι το % (78%) ποσοστό της G1P που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία. [G1P] η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση Assay volume: Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μL). Και,

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

C, η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με $3 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$ για τη rmGPb και με $1 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$ για τη h1GPa.

Άρα συνολικά:

[G1P]final(mM)	rmGPb		h1GPa	
	Limit	f	Limit	f
1	-	-	0.0312	780
2	0,0624	520	0.0624	1560
3	0.0936	780	0.0936	2340
4	0.1248	1040	0.1248	3120
6	0.1872	1560	0.1872	4680
10	0.312	2600	-	-

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mM) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten ($K_m(\text{app.})$, mM) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten:

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

v: ταχύτητα

V_{max}: μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

K_M: σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, έγινε η καμπύλη (nonlinearfit) $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η K_M και οι $K_M(\text{app.})$, υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver. Για τον υπολογισμό της K_i , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι $K_M(\text{app.})$ παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον yy' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των $K_M(\text{app.})$ και στον xx' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (linearfit) 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:

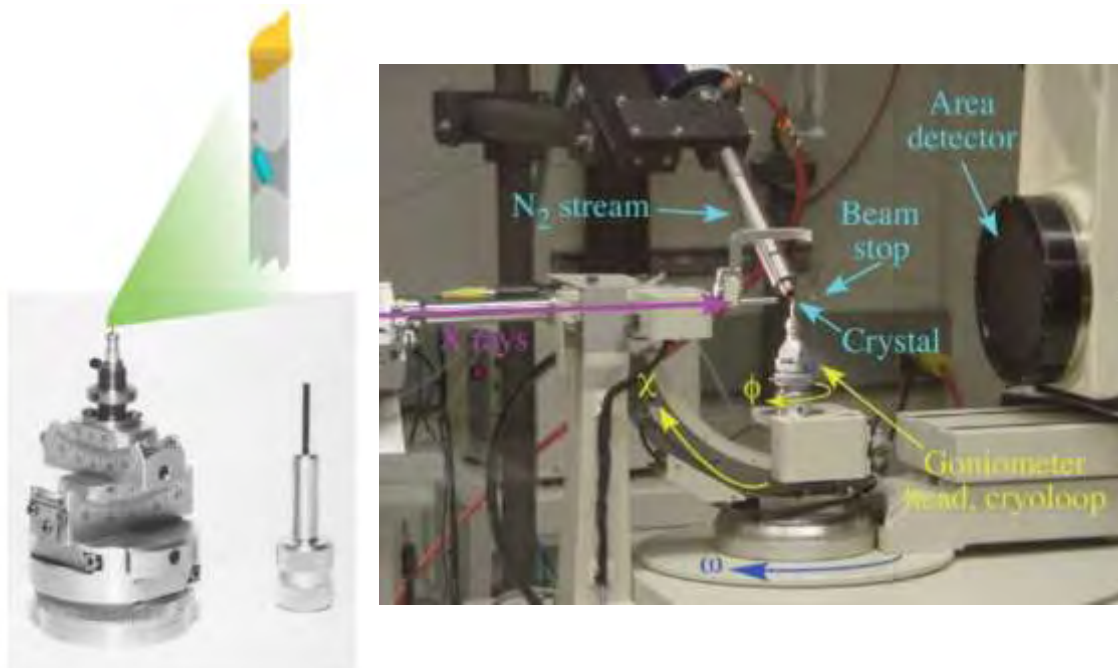
$$y = ax + b$$

όπου, a είναι η κλίσης της ευθείας (gradient ή slope)

b είναι η τεταγμένη επί της αρχής (intercept)

2.17 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη αναστολέων στην GP. Ο κρύσταλλος της *rmGPb* (T-στερεοδιαμόρφωση) τοποθετήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γωνιόμετρο και όλο το σύστημα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη κατάλληλη υποδοχή 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 2.6 : Αριστερά: πλήρης κεφαλή γωνιομέτρου, με υποδοχή τριχαιδούς σωλήνα στην κορυφή. Δεξιά: Στην εικόνα φαίνεται ένα περιθλασίμετρο 4 κύκλων. Οι ακτίνες X προέρχονται από τα δεξιά από μία περιστρεφόμενη άνοδο (δε διακρίνεται) και κατευθύνονται για να χτυπήσουν τον κρύσταλλο. Ένας CCD ανιχνευτής ανιχνεύει τις ανακλάσεις. Ο κρύσταλλος διατηρείται παγωμένος από ένα ρεύμα ψυχρού αέριου αζώτου. Η μικρή θολερότητα ακριβώς δεξιά της κεφαλής του γωνιομέτρου είναι η συμπύκνωση της υγρασίας του αέρα καθώς ψύχεται από το ρεύμα αζώτου. Η περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από τους άξονες ϕ και χ κατευθύνει πολλές ανακλάσεις προς τον ανιχνευτή. Στη διάταξη που παρουσιάζεται, οι άξονες ϕ , 2θ και ω συμπίπτουν [49]

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 2.6 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτινών-X

2.18 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC [42,43] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [44]. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα Coot [45,46] και βελτιστοποίησης με το REFMAC [42,43]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στο

μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη 2Fobs-Fcalc. Μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement). Τέλος, η βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο. Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας Fobs-Fcalc και 2 Fobs-Fcalc, 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 με το πακέτο προγραμμάτων CCP4 [44]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας Fobs-Fcalc και 2Fobs-Fcalc. 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 [47].

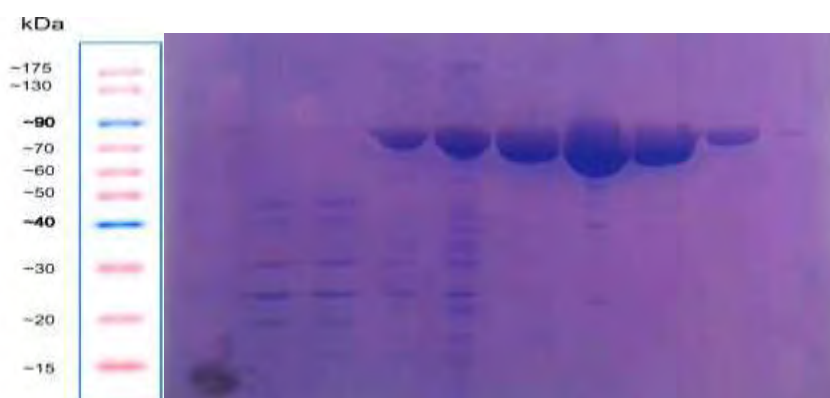
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της gmGPb

Η απομόνωση της gmGP έγινε από συνολικά 3 κόνικλους. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 12 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.



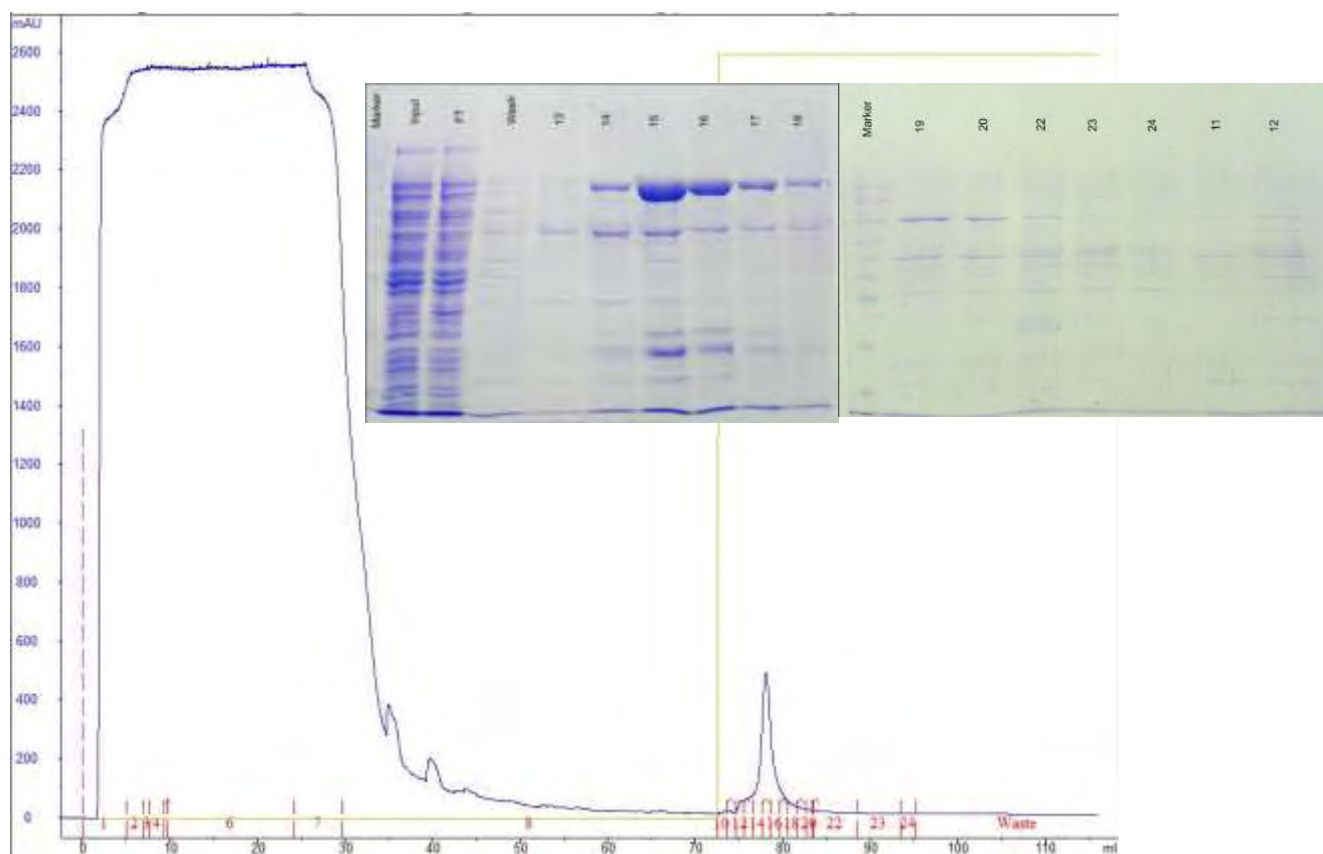
Εικόνα 3.1: 12% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κόνικλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: στο τέλος της διαδικασίας παραλαβής του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: πριν την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και συγκεκριμένα στην καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον πριν την ρύθμιση του pH, διαδρομή 3 (3^H ΗΜΕΡΑ) μετά από διαύγαση και ογκομέτρηση για προσθήκη EDTA και β-μερκαπτοαιθανόλης, Διαδρομή 4: στάδιο κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης της GPb, ογκομέτρηση πριν την προσθήκη AMP, διαδρομή 5: πρώτη κρυστάλλωση, διαδρομή 6: δεύτερη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: τρίτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 8: τέταρτη ανακρυστάλλωση.

Παρατηρούμε πως ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η gmGPb, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Τέλος, στη διαδρομή 8, 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:

⇒ **1,04 gmGPb ανά 2.3kg σκελετικών μυών κόνικλων.**

3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση hIGPb

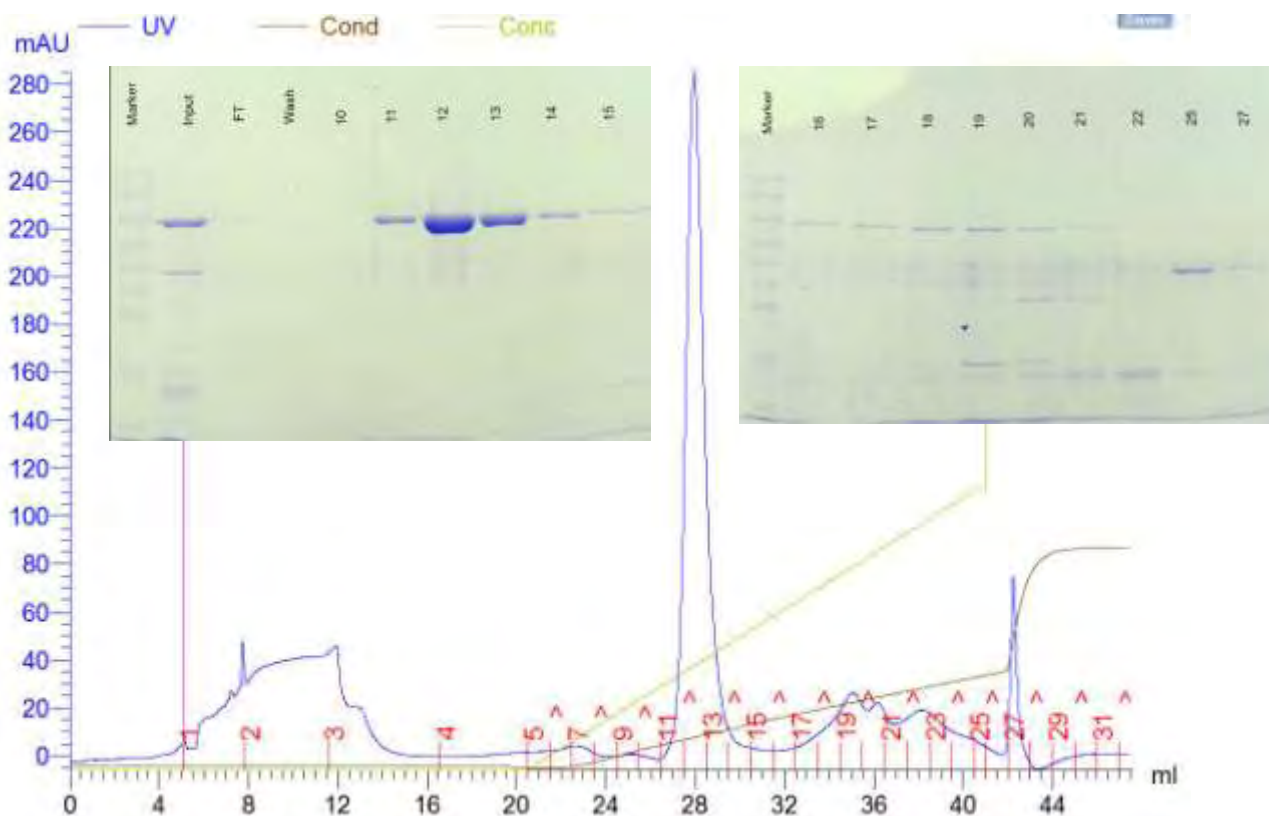
Το πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της hIGPb βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εξαιτίας της ετικέτας των ιστιδινών που διαθέτει, εμφανίζει συγγένεια με τα Co^{2+} τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια σεφαρόζης στη στήλη. Η λύση και η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το διάλυμα A που περιείχε 20 mM β -GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0. Η χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, 20 mM δεν είναι αρκετή ώστε το ιμιδαζόλιο να αποτρέψει την αποσύνδεση της πρωτεΐνης, άλλα απέτρεπε, σε ένα βαθμό, την μη ειδική σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Το διάλυμα B περιείχε 20 mM β -GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0. Η αυξημένη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου απομάκρυνε τις προσδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Στην Εικόνα 3.2, παρουσιάζονται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 3.2 : 10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Πρώτο βήμα καθαρισμού της hIGP (HiTrap TALON crude, GE Healthcare). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυσης. SDS-PAGE αριστερά: Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through, κλάσματα 1-7), διαδρομή 4: πλύση της

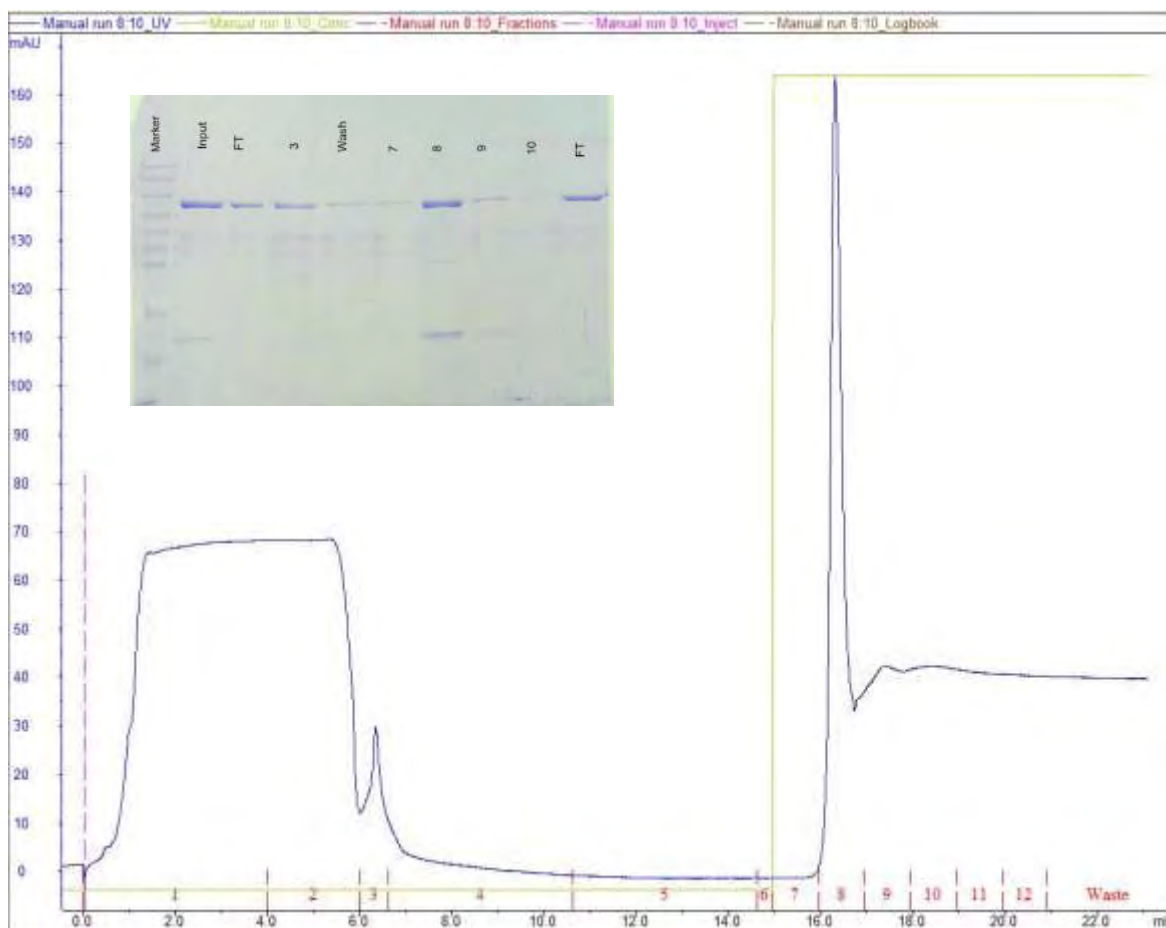
στήλης (Wash, κλάσμα 8), διαδρομές 5-10 έκλουση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 13-18). SDS-PAGE δεξιά: Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: κλάσμα 19, διαδρομή 3: κλάσμα 20, διαδρομή 4: κλάσμα 22, διαδρομή 5: κλάσμα 23, διαδρομή 6: κλάσμα 24, διαδρομή 7: κλάσμα 11, , διαδρομή 8: κλάσμα 12.

Το δεύτερο στάδιο απομόνωσης και καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η hIGP προσδένεται στη στήλη ResourceQ λόγω του αρνητικού φορτίου της σε pH 8.0. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα Tris 20 mM pH 8, DTT 1 mM (διάλυμα A) 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 A 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. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη εκλούεται με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα B), διότι αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζονται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 3.3 : 10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Δεύτερο βήμα καθαρισμού της hIGP με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Resource Q). Η πρωτεΐνη εκλύεται με διαβάθμιση του διαλύματος B. Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυσης. SDS-PAGE αριστερά: 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: κλάσμα 10, διαδρομή 6: κλάσμα 11, διαδρομή 7: κλάσμα 12, διαδρομή 8: κλάσμα 13, διαδρομή 9: κλάσμα 14, διαδρομή 10: κλάσμα 15. SDS-PAGE δεξιά: Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: κλάσμα 16, διαδρομή 3: κλάσμα 17, διαδρομή 4: κλάσμα 18, διαδρομή 5: κλάσμα 19, διαδρομή 6: κλάσμα 20, διαδρομή 7 : κλάσμα 21, , διαδρομή 8 : κλάσμα 22, διαδρομή 9: κλάσμα 25, διαδρομή 10: κλάσμα 27.

Το τρίτο στάδιο της απομόνωσης και καθαρισμού της hIGPb πραγματοποιήθηκε μετά από πέψη με την πρωτεάση TEV. Βασίστηκε στο γεγονός ότι η άτμητη πρωτεΐνη εξακολουθούσε να εμφανίζει συγγένεια με τα Ni^{2+} που βρίσκονται ακινητοποιημένα στη στήλη, ενώ η τμημένη πρωτεΐνη δε συνδέθηκε στη στήλη, ως αποτέλεσμα της πέψης με την πρωτεάση TEV. Επιπλέον, έγινε διαχωρισμός από την πρωτεάση TEV (27 KDa) η οποία διέθετε ετικέτα ιστιδινών και προσδέθηκε στη στήλη μαζί με την άτμητη hIGPb. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα A που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole. Η έκλυση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διάλυμα B που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole.



Εικόνα 3.4 : 10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Τρίτο βήμα καθαρισμού της hIGP μετά την τμήση της ετικέτας συγγενείας από την πρωτεάση TEV (His-Trap). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυσης. 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: κλάσμα 3, διαδρομή 5: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομή 6: κλάσμα 7, διαδρομή 7: κλάσμα 8, διαδρομή 8: κλάσμα 9, διαδρομή 9: κλάσμα 10, διαδρομή 10: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through).

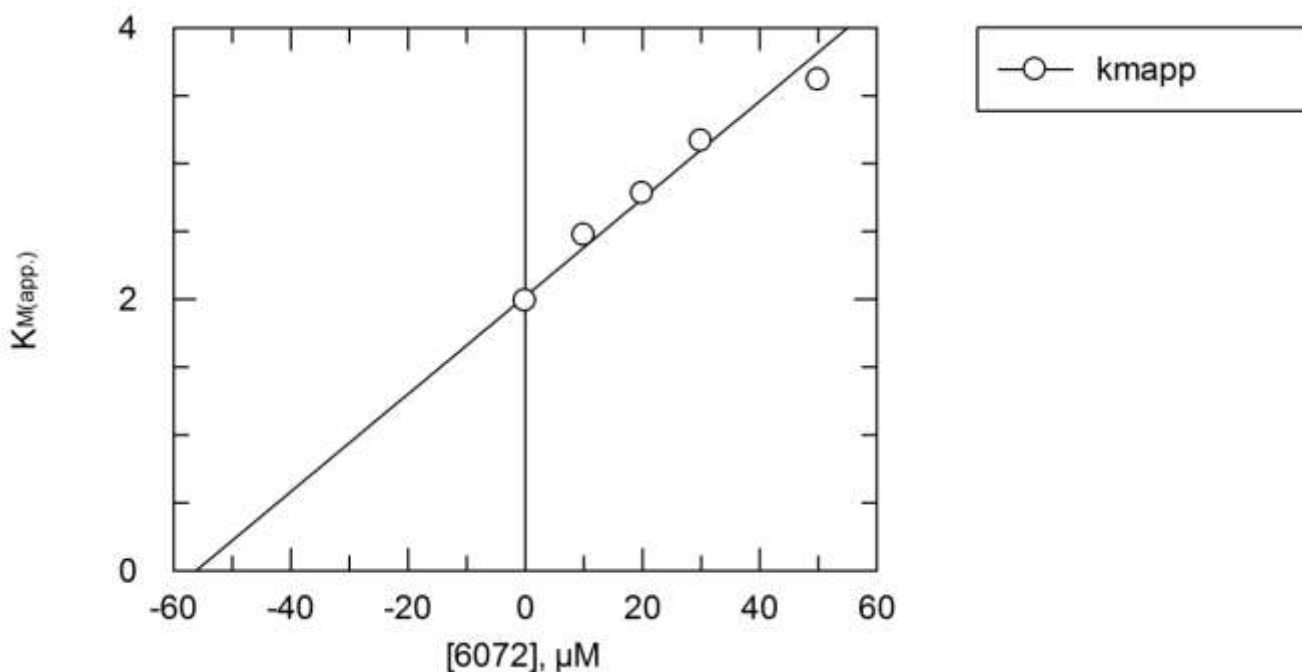
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δεν κόπηκα όλη η ποσότητα της hIGP από την TEV.

Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν:

- 55μg ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας

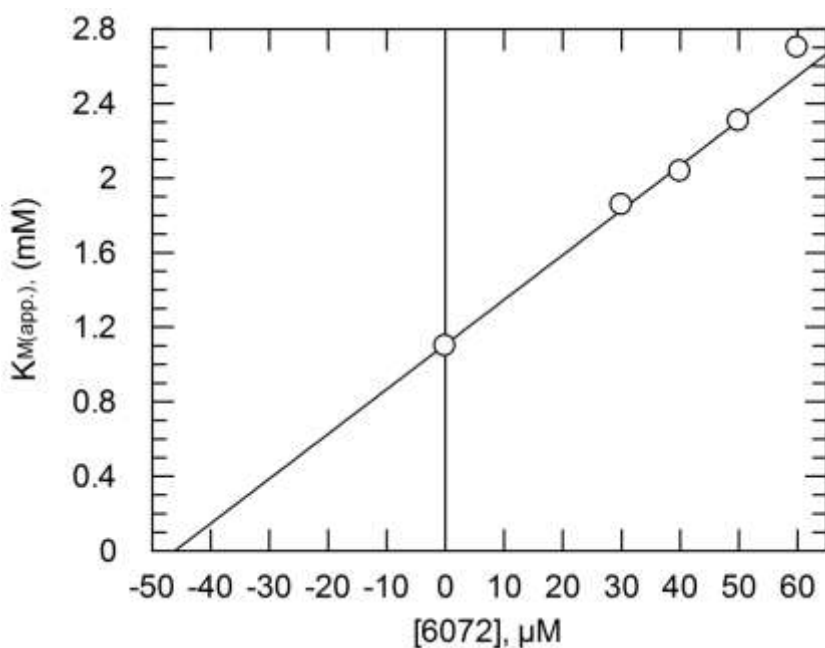
3.2. Κινητικές μελέτες

3.2.1. Προσδιορισμός της k_i του αναστολέα 6072 έναντι της rmGPb



$$K_i = 56.11 \mu M \pm 4.42$$

3.2.2 Προσδιορισμός της k_i του αναστολέα 6072 έναντι της hIGPa



$K_i=46.13 \mu\text{M} \pm 1.58,$

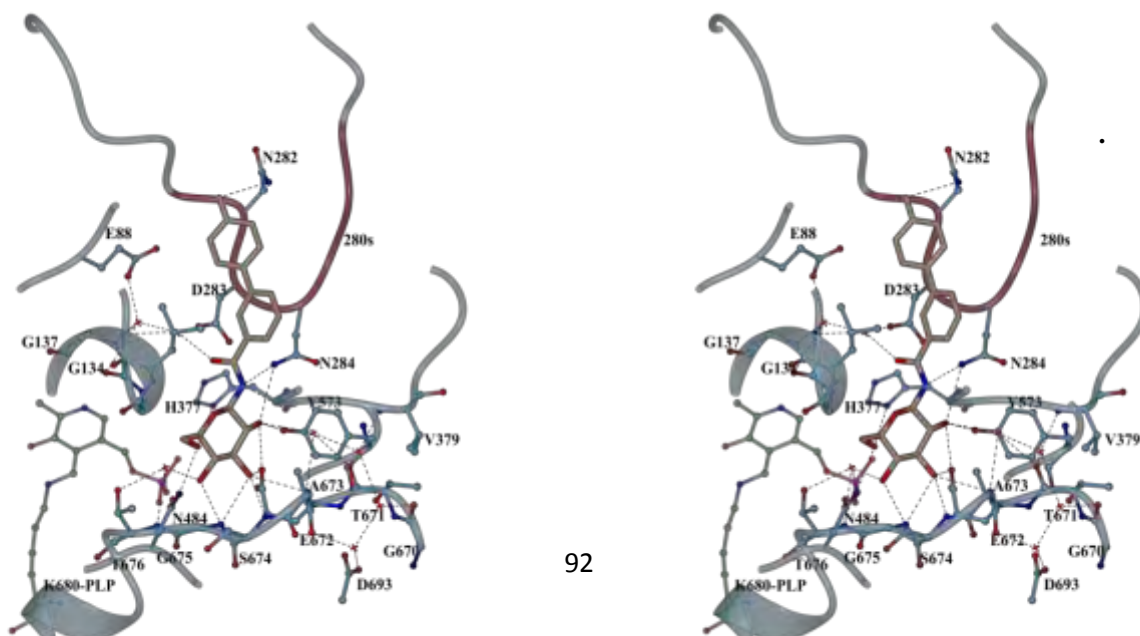
3.3. Δομικά αποτελέσματα

Στον Πίνακα 3.1 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο της gmGPb. Στην Εικόνα 3.2 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). Παρουσιάζεται επίσης και ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2F_{obs}-F_{calc}, για το μόριο του αναστολέα μετά την βελτιστοποίηση εικόνα 3.3.

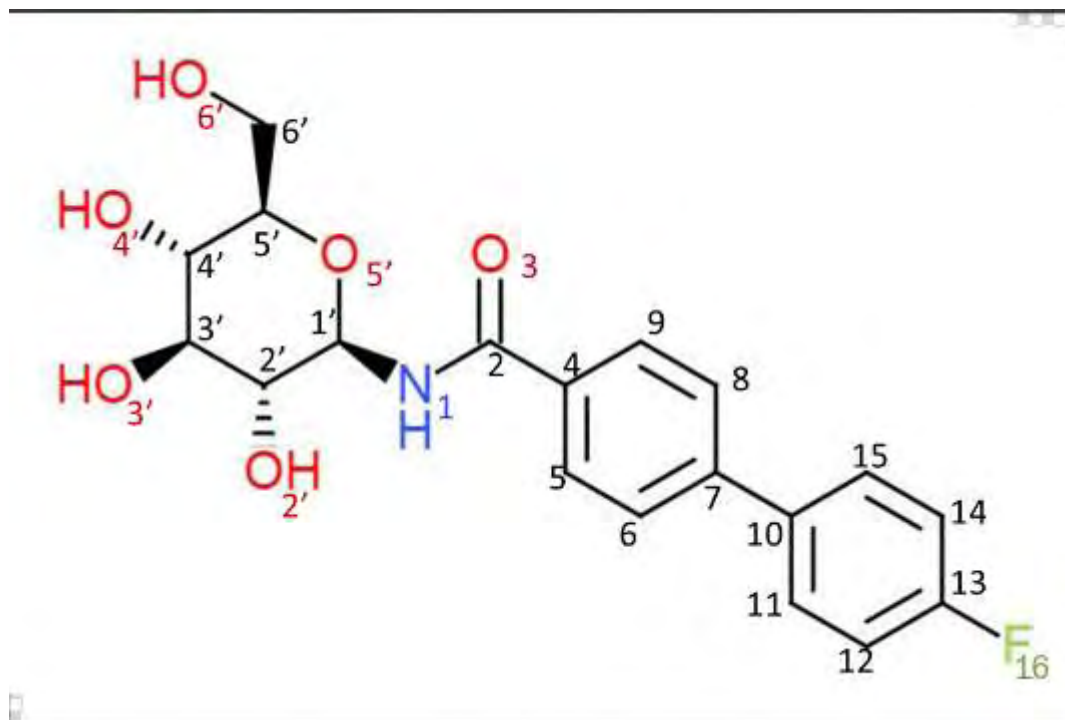
Inhibitor atom	Protein Residues (atoms)	
	Hydrogens bonds (-3.35 Å)	Van der Waals interactions (-4.0 Å)
O2'	Water-170:2.94, Asn284(ND2):3.27, Tyr573(OH):3.03, Glu672(OE2):3.02	His377(O)
O3'	Glu672(OE2):2.78, Ala673(N):3.16, Ser674 (N):2.86, Gly675(N):3.02,	Glu672 (CG,CD,C), Ala673(C,CA,CB), Ser674(CA,C), Gly675(CA)
O4'	Water-96:2.60, Gly675(N):2.81	Asn484 (ND2), Ser674 (CA,CB,C), Gly675 (C,O,CA), Thr676 (N,CG2)
O5'		Leu136 (N), His377(CB,ND1,O)
O6'	His377(ND1):2.71, Asn484 (ND2):2.70,	Leu139 (CD2), His377 (CE1,CG), Val455(CB,CG1,CG2), Asn484(OD1,CG),

O2	Water-193:2.83	Leu136(CB,N), Asn284(ND2)
C1'		His377(O)
C2'		Water-170, Glu672(OE2), His377(O)
C3'		Water-96 , Gly675(N), Glu672 (OE2)
C4'		Water-96, Gly675(N), Asn484(ND2)
C5'		Water-96, Gly135(C), Leu136(N)
C6'		Gly135(O,C), His377 (ND1), Leu136 (N), Asn484 (ND2)
N1	Asn284 (ND2):3.18, His377(O):3.19	His377 (C)
C2		Water-193 , Leu136 (CB), Asn284 (ND2)
C3		Asn284 (ND2)
C4		Asn284(ND2), His377 (CB,O), Thr378 (CG2)
C5		Asp339(CG,OD2), Thr378(CG2)
C6		His341 (CE1,NE2)
C7		Asn284 (N), His341 (CE1,NE2)
C8		Water-193, Asn284(ND2,N)
C9		Asn284(N), His341 (CE1,NE2)
C10		Asn282(O), Phe285(O) His341(NE2)
C11		Water-76, Asn282(ND2), Asn282(O), Phe285(O), Arg292(NH2)
C12		Asn282 (C,ND2), Arg292 (NH2) , Asn282 (O)
C13		Asn133(ND2), Asn282(O), Glu88 (OE2)
C14		Glu88(OE2), His341(CE1)
F15	Asn282(ND2):3.16	Tyr280 (C,O), Asn282 (C,O,CG), Arg292 (CG,NH1,NH2)
TOTAL	16	100

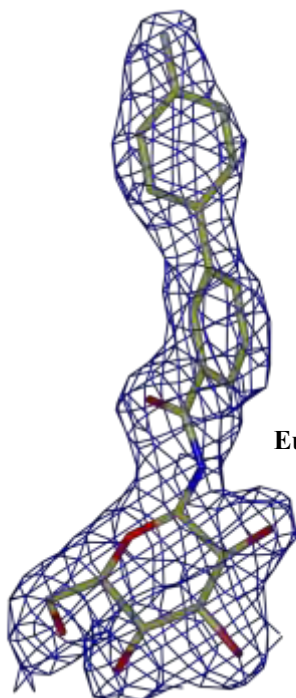
Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της tmGrb μεταξύ του αναστολέα 6072 και των αμινοξέων της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.2: Πρόσδεση του 6072 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια ύδατος με κόκκινο χρώμα.

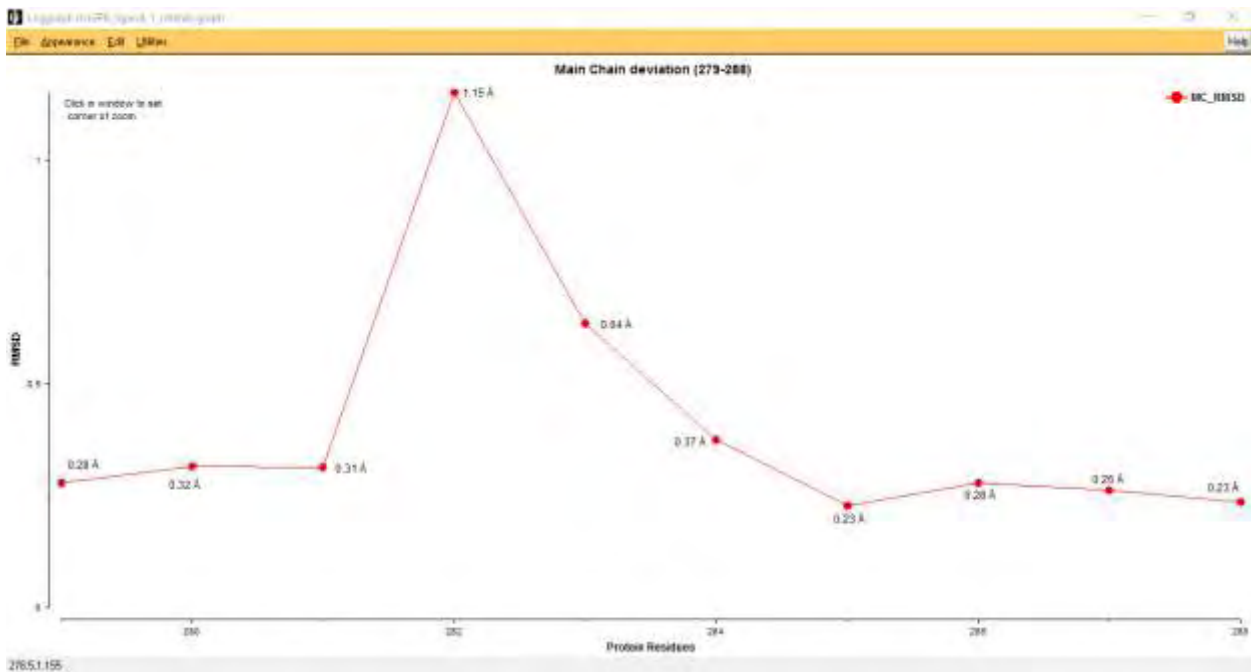


Εικόνα 3.3: Χημική δομή του αναστολέα 6072.

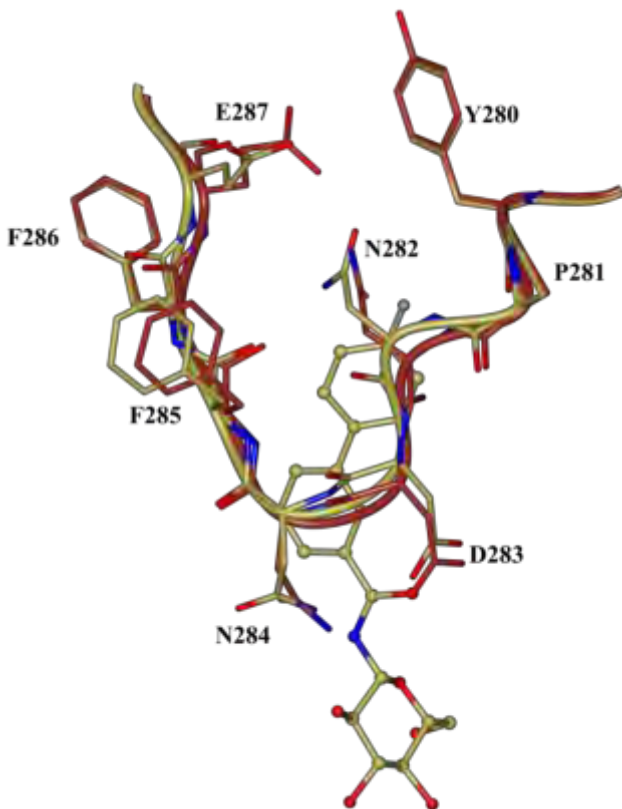


Εικόνα 3.3 Β) Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fobs-Fcalc.

Ο αναστολέας 6072 όταν συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο αλλάζει την θέση του βρόχου 280 S. Για τον λόγο αυτό κάναμε υπέρθεση (*superpose*) μέσω του προγράμματος CCP4.

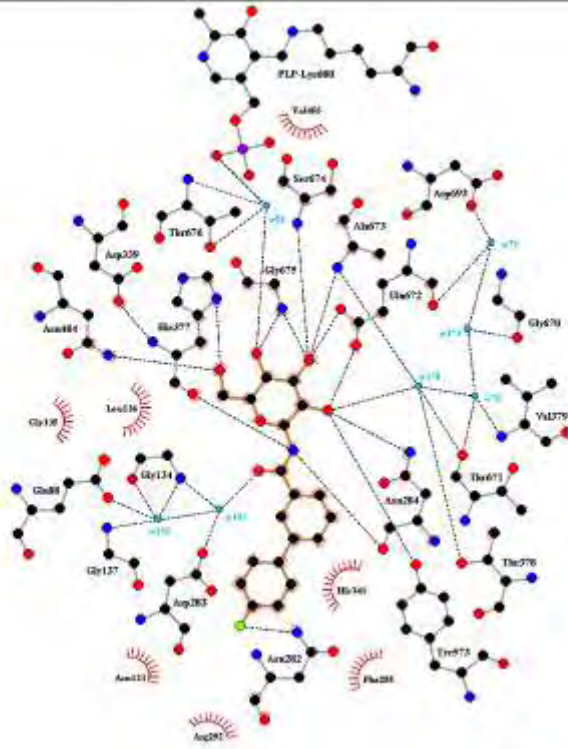


Εικόνα 3.4: Υπέρθεση (*superpose*) μέσω του προγράμματος CCP4.



Εικόνα 3.5: Υπέρθωση (*superpose*) του αναστολέα με τα αμινοξέα του βρόχου 280S. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η *native* δομή απουσία αναστολέα.

Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται ένα σχηματικό διάγραμμα δύο διαστάσεων της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων των αναστολέα μετά τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου με το πρόγραμμα LigPlot [48].



Εικόνα 3.6: Σχηματικό διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται από την πρόσδεση του αναστολέα 6072.

V. Συζήτηση

Ο διαβήτης τύπου 2 (T2D), είναι η πιο συνηθισμένη μεταβολική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από ανώμαλη έκκριση ινσουλίνης που προκαλείται από εξασθενημένη λειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων και αντίσταση στην ινσουλίνη στους ιστούς-στόχους. 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*).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) είναι το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου καταλύοντας το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης του γλυκογόνου ως προς 1-φωσφορική γλυκόζη (*Glc-1-P*). Λόγω αυτού του κεντρικού ρόλου, το ένζυμο αυτό θεωρείται στόχος για το σχεδιασμό των υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου βιολογικά ($MW = 97.500 Da$, 842 κατάλοιπα) είναι ένα διμερές που έχει ως συμπαράγοντα την φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*). Υπάρχουν τρεις ισομορφές της *GP* η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου και η εγκεφαλική φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Οι ισομορφές αυτές εμφανίζουν περίπου 80% ομολογία. Οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ ηπατικής και μυϊκής φωσφορυλάσης δεν προκύπτουν από διαφορές στα κατάλοιπα που δεσμεύουν τους προσδέτες. Δεν υπάρχουν εισαγωγές ή διαγραφές στην αλληλουχία του ενζύμου του ήπατος σε σύγκριση με την ισομορφή του ενζύμου του μυός και από τις διαφορές των 171 αμινοξέων μεταξύ των δύο ενζύμων, το 49% (85 αμινοξέα) είναι συντηρητικά και τα περισσότερες αλλαγές των αμινοξέων είναι λειτουργικά ουδέτερες και το ενεργό κέντρο εμφανίζει 100% ομολογία. 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). Η μετατροπή της *b* σε *a* γίνεται με φωσφορυλίωση στη *Ser14* της *GPb* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. 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.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε ο αναστολέας 6072 για την ανασταλτική επίδραση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι ανάλογο γλυκόζης, άρα προσδέεται στο καταλυτικό κέντρο. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες του αναστολέα 6072 έναντι της *rmGPb* και της *hlGPa*. Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τον 6072 έναντι της *rmGPb* ήταν $56.11 \pm 4.42 \mu M$ και έναντι της *hlGPa* ήταν $K_i = 46.13 \pm 1.58 \mu M$. Ο αναστολέας 6072 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την *hlGPa* σε σχέση με την *rmGPb*. Επίσης έγιναν και δομικές μελέτες σε

σύμπλοκο της rmGPb με τον 6072. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της rmGPb μεταξύ του αναστολέα 6072 και των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση του αναστολέα με αμινοξέα του βρόχου 280s (Asn 282, Asp 283, Asn 284, Phe 285, Phe 286) παρέχει τη δομική βάση της ισχυρής ανασταλτικής δράσης, καθώς σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στην καταλυτική θέση, προωθώντας την T στεροδιαμόρφωση. Επιπλέον, η δομική ανάλυση αποκάλυψε κρίσιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συνδέτη τριαζολίου και του οξυγόνου της κύριας αλυσίδας της His377.

Εν κατακλείδι, 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*.

VI. Παράρτημα

AMP	Adenosine Monophosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
APS	Ammonium Persulfate
BSA	Bovine serum albumin
GLUT	Glucose transporters
GST	Glutathione <i>S</i> -transferase
NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
PhK	Phosphorylase kinase
PLP	Pyridoxal phosphate
GP	Glycogen Phosphorylase
hlGP	Human liver Glycogen Phosphorylase
rmGP	Rabbit muscle Glycogen Phosphorylase
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UDP	Uridine diphosphate

Met (M)	Μεθειονίνη
Pro (P)	Προλίνη
Leu (L)	Λευκίνη
Ile (I)	Ισολευκίνη
Phe (P)	Φαινυλαλανίνη
Val (V)	Βαλίνη
Ala (A)	Αλανίνη
Asp (D)	Ασπαρτικό οξύ
Glu (E)	Γλουταμικό οξύ
Lys (K)	Λυσίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Ser (S)	Σερίνη
Thr (T)	Θρεονίνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
Cys (C)	Κυστεΐνη
Gln (Q)	Γλουταμίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Trp (W)	Τρυπτοφάνη
His (H)	Ιστιδίνη
Gly (G)	Γλυκίνη

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Laios K, Karamanou M, Saridaki Z, Androutsos G. Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes. *Hormones (Athens)* 2012;11:109-13.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9
- [6] 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
- [7] Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014;383:69-82.
- [8] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
- [9] Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005;307:380-4.
- [10] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2013.
- [11] Peter J. Roach, Anna A. Depaoli-Roach, Thomas D. Hurley, and Vincent S. Tagliabracci, Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes *Biochem J* . 2012 February 1; 441(3): 763–787.
- [12] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998;336 (Pt 1):19-31
- [13] Dimitrios T. Karamitsos, *The story of insulin discovery*, Aristotle University, Thessaloniki, Greece, 2011
- [14] E.D.Lowe, M.E.M.Noble, V.T.Skamnaki, N.G.Oikonomakos, D.J.Owen and L.N.Johnson, *The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide*

substrate complex: kinase substrate recognition, *The EMBO Journal* Vol.16 No.22 pp.6646–6658, 1997.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] Christopher B. Newgard, Peter K. Hwang & Robert J. Fletterick (1989) The Family of Glycogen Phosphorylases: Structure and Function, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24:1, 69-99, DOI: 10.3109/10409238909082552

[19] 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

[20] Lorraine Agius, Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism, Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK, 2015

[21] 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

[22] Kenneth A. Johnson and Roger S. Goody, The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper, Published online 2011 Sep. doi: [10.1021/bi201284u](https://doi.org/10.1021/bi201284u)

[23] Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 1965;12:88-118

[24] Nicholas C. Price, Lewis Steven, Βασικά στοιχεία ενζυμολογίας, Τρίτη έκδοση, ISBN: 978-960-394-738-7

[25] Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170-1.]

- [26] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
- [27] Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;83:791-8.
- [28] Ettre LS, Sakodynskii KI. Tswett, M.S. And the Discovery of Chromatography .1. Early Work (1899-1903). *Chromatographia* 1993;35:223-31.
- [29] Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, GE Healthcare
- [30] Dermot Walls and Sinéad T. Loughran, Protein Chromatography Methods and Protocols, School of Biotechnology and National Centre for Sensor Research, Dublin City University, Dublin, Ireland, DOI 10.1007/978-1-60761-913-0
- [31] Chunxia Zhao, Lance M. Hellman, Xin Zhan, Willis S. Bowman, Sidney W. Whiteheart, and Michael G. Fried, Hexahistidine-Tag-Specific Optical Probes for Analyses of Proteins and Their Interactions, *Anal Biochem.* 2010 April 15; 399(2): 237–245. doi:10.1016/j.ab.2009.12.028.
- [32] Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol* 2011;681:259-80.
- [33] HealthCare G. Affinity Chromatography - Principles and Methods: GE HealthCare; 2007
- [34] Kopperschlager G, ; Bohme, H-J.; Hofmann E.. Cibacron Blue F3G-A and Related Dyes as Ligands in Affinity Chromatography: Springer; 2015
- [35] HealthCare G. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: GE HealthCare; 2010.
- [36] José Arnau , Conni Lauritzen, Gitte E. Petersen, John Pedersen, Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins, Unizyme Laboratories A/S, Dr. Neergaards vej 17, DK-2970 Hørsholm, Denmark Available online 28 December 2005
- [37] David S. Waugh Protein Engineering Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick, P.O. Box B, Frederick, MD, 21702-1201, USA An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags, *Protein Expr Purif* . 2011 December ; 80(2): 283–293. doi:10.1016/j.pep.2011.08.005

- [38] Davey J, Lord M. Essential cell biology : a practical approach. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2003.
- [39] 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.
- [40] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3Deoxy-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.
- [41] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998.
- [42] 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.
- [43] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [44] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3
- [45] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32
- [46] Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.
- [47] 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.
- [48] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 1995;8:127-34
- [49] Rhodes G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006

