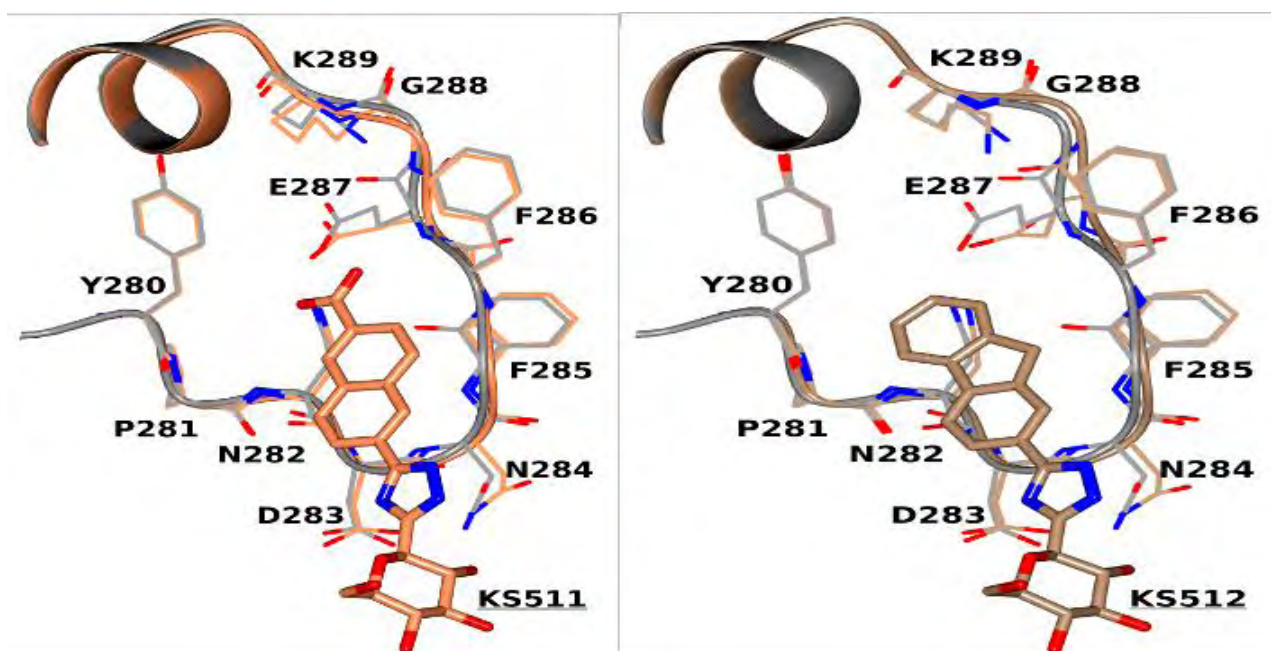


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ  
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



ΜΠΑΡΚΑΣ ΘΩΜΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ  
ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ  
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**KINETIC AND CRYSTALLOGRAPHIC BINDING STUDIES OF GLUCOSE  
ANALOGUES TO GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ  
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**ΟΝΟΜΑ: ΜΠΑΡΚΑΣ ΘΩΜΑΣ**

**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

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

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	8
Περίληψη.....	9
Abstract.....	11
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	12
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	13
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	13
1.2 Ομοίωση της γλυκόζης.....	14
1.2.1 Ινσουλίνη .....	14
1.2.2 Γλυκαγόνη.....	15
1.2.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	15
1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	17
1.2.3.2 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	17
1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	19
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	19
1.4.1 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	22
1.4.2 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	23
1.4.2.1 Κέντρο φωσφορυλίωσης Ser 14.....	24
1.4.2.2 Καταλυτικό κέντρο.....	24
1.4.2.3 Κέντρο αναστολής.....	24
1.4.2.4 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	25

1.4.2.5 Αλλοστερικό κέντρο.....	25
1.4.2.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	25
1.4.2.7 Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης.....	26
1.4.3 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	26
1.5 Κρυσταλλογραφία.....	28
1.5.1 Δομή του κρυστάλλου.....	28
1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	29
1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ.....	31
1.5.4 Ο Νόμος του Bragg.....	31
1.5.5 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	33
1.5.6 Διάγραμμα Ramachandran.....	35
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	36
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες.....	38
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων .....	39
2. Υλικά και μέθοδοι.....	43
2.1 Αντιδραστήρια.....	43
2.2 Οργανολογία.....	45
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	45
2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας.....	46
2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	46
2.5.1 Χημικός μετασχηματισμός.....	46
2.6 Υγρή χρωματογραφία - Σύστημα FPLC.....	46
2.6.1 Χρωματογραφία συγγένειας.....	47
2.6.1.2 Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni <sup>2+</sup> .....	48

2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής .....	49
2.6.2.1 Στήλη Resource Q.....	50
2.7 Πρωτεάση TEV.....	51
2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	51
2.8.1 Χρώση πηκτώματος.....	53
2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford.....	54
2.10 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb).....	55
2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (hlGP).....	61
2.12 Φωσφορυλίωση της GP.....	64
2.13 Κινητικές μελέτες έναντι της GP.....	64
2.13.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου.....	65
2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα.....	66
2.13.3 Υποστρώματα.....	67
2.13.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	69
2.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	70
2.14.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων Grb.....	70
2.14.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	71
2.14.3 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου.....	72
3.Αποτελέσματα.....	74
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών.....	74
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της rmGPb.....	74
3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της hlGPb.....	75
3.2Κινητικές μελέτες.....	79

3.2.1 Προσδιορισμός της K <sub>i</sub> του αναστολέα KS511 έναντι της rmGPb.....	79
3.2.2 Προσδιορισμός της K <sub>i</sub> του αναστολέα KS512 έναντι της rmGPb.....	79
3.3 Δομικά αποτελέσματα.....	80
Συζήτηση.....	88
Βιβλιογραφία.....	91

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Φεβρουάριο του 2017 έως το Φεβρουάριο του 2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η καθοδήγηση και η βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ήταν καθοριστικές. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική και Δρ. Κοντού Μαρία για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Επίσης ευχαριστώ και τον καθηγητή *Somsák László* καθώς οι χημικές ενώσεις που μελετήθηκαν συντέθηκαν στο εργαστήριο του, στο Πανεπιστήμιο του *Debrecen* της Ουγγαρίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στους υποψήφιους διδάκτορες Ευθύμιο Κυριάκη και Γεώργιο Στραβοδήμο για την απεριόριστη στήριξη, την ενθάρρυνση και την βοήθεια που μου παρείχαν, αλλά και για την υπομονή και τη διάθεση τους, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη τους και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια.



## Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης θεωρείται μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας ανά την υφήλιο. Πρόκειται για μεταβολική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) λόγω διαταραχής στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η υπεργλυκαιμία αποτελεί απόρροια ελαττωματικής έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας ή/και ανεπαρκούς ευαισθησίας των κυττάρων-στόχων στην ινσουλίνη. Η θεραπεία κατά του διαβήτη αποσκοπεί στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την σύνθεση ενώσεων για κάποιο κέντρο σύνδεσης του ενζύμου μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Glycogen Phosphorylase, GP, EC: 2.4.1.1*) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης. Υπάρχει σε δύο αλληλομετατροπόμενες μορφές: τη φωσφορυλιωμένη *GP<sub>a</sub>* (βρίσκεται στην *R* στεροδιαμόρφωση και εμφανίζει υψηλή δραστικότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) και την από-φωσφορυλιωμένη *GP<sub>b</sub>* (βρίσκεται στην *T* στεροδιαμόρφωση και έχει χαμηλή δραστικότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) οι οποίες είναι σε ισορροπία. Ο βρόχος *280s* (κατάλοιπα 282-286) είναι υπεύθυνος για την αλλοστερική μετατροπή από την *T* στην *R* στεροδιαμόρφωση, καθώς στην *T* στεροδιαμόρφωση μπλοκάρει την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Ένας από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων είναι το ένζυμο ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*hIGPa*). Το καταλυτικό κέντρο της *hIGPa* βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών μελετών, οι οποίες εστιάζουν στο σχεδιασμό αναλόγων γλυκόζης με βάση την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου.

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση της *GP<sub>b</sub>* από κονίκλους (*rmGP<sub>b</sub>*) και ανθρώπινης ηπατικής *GP<sub>b</sub>* (*hIGP<sub>b</sub>*) από μετασηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα *ÄKTA-FPLC (GE, HealthCare)*. Πραγματοποιήσαμε φωσφορυλίωση της *hIGP<sub>b</sub>*, ώστε να μετατραπεί σε *hIGP<sub>a</sub>* ώστε να γίνουν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) δύο εν δυνάμει αναστολέων της *GP*. Οι τιμές των  $K_i$  που υπολογίστηκαν για τον ***KS511*** και τον ***KS512*** έναντι της *hIGPa* ήταν  $5.05 \pm 0.40 \mu\text{M}$  και  $1.19 \pm 0.13 \mu\text{M}$  αντίστοιχα. Στην συνέχεια αναπτύχτηκαν κρύσταλλοι της *rmGP<sub>b</sub>* για κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ανάδειξη του τρόπου πρόσδεσης των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο και

ειδικότερα στη β-εσοχή του ενζύμου, καθώς και στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Τα αποτελέσματα αυτά συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της β-εσοχής της GP ώστε μέσω του από τη δομή κατευθυνόμενου σχεδιασμού αναστολέων να συντεθούν νέες ενώσεις που θα έχουν χαμηλότερες σταθερές αναστολής με αποτέλεσμα να αναστέλλουν πιο ισχυρά το ένζυμο.

## Abstract

Diabetes mellitus is considered to be one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide. This is a metabolic disorder characterized by high blood glucose (hyperglycaemia) due to a disorder of glucose metabolism. Hyperglycaemia is a result of faulty secretion of insulin from the pancreas and/or insufficient sensitivity of the target cells to insulin. The anti-diabetes treatment aims at maintaining blood glucose levels at a normally level. For this purpose, enzymes and hormones receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for structure-directed design of compounds that have high affinity for a binding site and can be used as hypoglycemic drugs.

Glycogen phosphorylase (GP, *EC: 2.4.1.1*) catalyzes the first step of glycogen catabolism to produce glucose-1-phosphate. It exists in two interconvertible forms: the phosphorylated GP<sub>a</sub> (R state; high activity; high substrate affinity) and the dephosphorylated GP<sub>b</sub> (T state; low activity; low substrate affinity) in equilibrium. The 280s loop (residues 282-286) is responsible for allosteric conversion from the T to R conformation, as in the T state blocks the entry to the catalytic center. One of the major molecular targets for the design of new hypoglycemic drugs is the enzyme glycogen hepatic phosphorylase. The catalytic center of hGP<sub>a</sub> is at the center of many studies that focus on designing glucose analogues based on the three-dimensional structure of the enzyme.

In this work, we isolated and purified muscle GP from rabbits (rmGP) and human liver GP (hGP) from recombinant bacteria with an automated ÄKTA-FPLC system (GE, HealthCare). We phosphorylated hGP<sub>b</sub> converting to hGP<sub>a</sub> for kinetic studies determining the inhibition constant (*K<sub>i</sub>*) values of two GP inhibitors. *K<sub>i</sub>* values for compounds **KS511** and **KS512** for hGP<sub>a</sub> were  $5.05 \pm 0.40 \mu\text{M}$  and  $1.19 \pm 0.13 \mu\text{M}$  respectively. Crystals of rmGP<sub>b</sub> were then grown for crystallographic studies. X-ray crystallography of the rmGP<sub>b</sub>-**KS511** and rmGP<sub>b</sub>-**KS512** complexes revealed the binding of inhibitors at the catalytic center and highlighted the important interactions for binding within the the catalytic center. This study will contribute to a better understanding of the SAR relationship in GP facilitating further structure driven inhibitor design of new glucose analogues.

## 1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Η νόσος του σακχαρώδη διαβήτη αποτελεί μια πανδημία για το σύγχρονο κόσμο. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για τον Διαβήτη (*International Diabetes Federation, IDF*) το 2013 έπασχαν από διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι και ο αριθμός αναμένεται να φτάσει τους 552 εκατομμύρια πάσχοντες έως το 2035.[1]

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια συστημακή μεταβολική ανωμαλία που χαρακτηρίζεται από τάση για χρόνια υπεργλυκαιμία και προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων με συνέπεια την ανεπάρκεια ινσουλίνης και/ή ελαττωμένης ανταπόκρισης του ιστού στην ινσουλίνη σε ένα ή περισσότερα σημεία στις σύνθετες οδούς ορμονικής δράσης οδηγούν σε διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπών και των πρωτεϊνών.[41]

Τα κλασικά συμπτώματα του ΣΔ αποτελούν η πολυουρία και η πολυδιψία που απορρέουν από την γλυκοζουρία που προκαλεί οσμωτική διούρηση και με την σειρά της διεγείρει το κέντρο δίψας. Επίσης, μερικές φορές παρατηρείται απώλεια βάρους, πολυφαγία και θαμπή όραση. Αν δεν αντιμετωπιστούν, οι μεταβολικές ανωμαλίες εντάσσονται με αποτέλεσμα την ανάπτυξη επικίνδυνων καταστάσεων (π.χ κετόξευση, μη κετονική υπεργλυκαιμία ή γαλακτική οξέωση) για την ζωή του ασθενούς.[2]

Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές του ΣΔ διακρίνονται σε μικροαγγειακές επιπλοκές όπως νεφροπάθεια (κίνδυνος πρόκλησης έλκους του ποδιού και ακρωτηριασμός), νευροπάθεια (γαστρεντερικά, καρδιαγγειακά προβλήματα, σεξουαλική δυσλειτουργία) και αμφιβληστροειδοπάθεια, και σε μακροαγγειακές ασθένειες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση. Η ανάπτυξη μικροαγγειακής νόσου φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την υπεργλυκαιμία, ενώ η μακροαγγειακή νόσος συγγενεύει αμεσότερα με την αντίσταση στην ινσουλίνη. [41]

Ο ΣΔ διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Κάποιες πιο ειδικές κατηγορίες διαβήτη οφείλονται σε εκ γενετής απώλεια των β-παγκρεατικών κυττάρων, γενετικά ελαττώματα στην δράση της ινσουλίνης, μολύνσεις, ενδοκриноπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος, διαβήτης επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά και διαβήτης που είναι αποτέλεσμα άλλων γενετικών συνδρόμων.[2]

### **1.1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ I**

Περίπου το 10% των ασθενών με διαβήτη πάσχει από τον τύπου 1 και εμφανίζουν απόλυτη εξάρτηση στην ινσουλίνη. Ο ΣΔ1 είναι μια αυτοάνοση οικογενή ασθένεια και σχετίζεται επίσης με περιβαλλοντικούς παράγοντες που εξακολουθούν να είναι ακόμη μη καθορισμένοι. Στον ΣΔ1 υπάρχει καταστροφή των παγκρεατικών κύτταρων, που οδηγεί σε ελάττωση και τελικά παύση έκκρισης της ινσουλίνης. Ο ρυθμός καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος δεν είναι σταθερός και συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό (οξεία μορφή) σε νεαρά άτομα.

Η διαβητική κετοξέωση προκύπτει από ανεπάρκεια ινσουλίνης η οποία διεγείρει την αύξηση "ανταγωνιστικών" ορμονών όπως γλυκαγόνης, κατεχολαμινών, κορτιζόλης και αυξητικής ορμόνης και θέτει σε κίνδυνο την ζωή των ασθενών.[41]

### **1.1.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (ΣΔ2) ή αλλιώς μη-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης (NIDDM), οφείλεται στην μειωμένη ευαισθησία των ιστών στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (ανοχή στην ινσουλίνη), και αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης σε ασθενείς (της τάξης του 90%). Ο ΣΔ2 σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα κάτι το οποίο οφείλεται στην αντιρροπιστική απάντηση των β-κυττάρων του παγκρέατος ώστε να μειωθεί η ευαισθησία των ιστών στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης, μια κατάσταση που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Η μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη προκαλεί ελάττωση του καταβολισμού και της αποθήκευσης των υδατανθράκων, με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα και την ενεργοποίηση αντισταθμικής αύξησης στην έκκριση της ινσουλίνης.[4] Το κύριο αίτιο ανάπτυξης ΣΔ2 είναι η παχυσαρκία η οποία προηγείται του ΣΔ2. Η νόσος παρατηρείται σε μεσήλικες ή ηλικιωμένους ανθρώπους αν και τα τελευταία χρόνια η αύξηση της παχυσαρκίας σε νεαρά άτομα έχει οδηγήσει σε σταθερή αύξηση σε μικρότερες ηλικίες. Ωστόσο οι μηχανισμοί που συνδέουν την παχυσαρκία με την αντίσταση είναι ακόμα άγνωστοι.

## 1.2 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

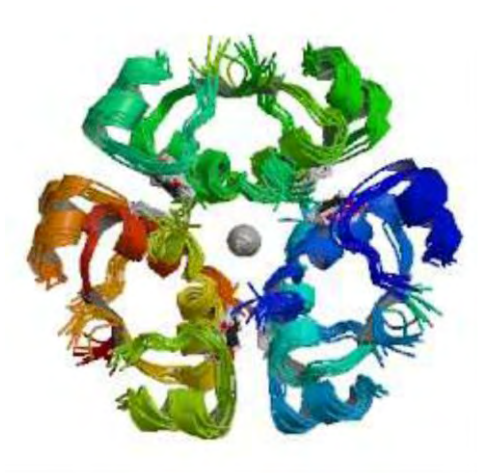
### 1.2.1 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 5.808 Da. Αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Με τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων, μηδενίζεται η δραστηριότητα του μορίου. Η ινσουλίνη συνδέεται πρώτα σε έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να ξεκινήσει η δράση στα κύτταρα στόχους της. Οι επακόλουθες επιδράσεις προκαλούνται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα και όχι από την ινσουλίνη. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης αποτελείται από 4 διακριτές υπομονάδες (2 α και 2 β) οι οποίες ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ινσουλίνη συνδέεται με τις α- υπομονάδες που βρίσκονται εντελώς έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Εξαιτίας όμως των δεσμών των β- υπομονάδων, τα τμήματα τους αυτοφωσφορυλιώνονται. Ενεργοποιείται έτσι μια τοπική κινάση τυροσίνης που φωσφορυλιώνει το IRS (υπόστρωμα του υποδοχέα ινσουλίνης) με συνέπεια τον έμμεσο προσανατολισμό του ενδοκυττάριου μεταβολικού μηχανισμού στην πρόκληση των επιθυμητών επιδράσεων στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών.

Η κύρια επίδραση της ινσουλίνης είναι η άμεση πρόσληψη και αποθήκευση γλυκόζης από το ήπαρ με τη μορφή γλυκογόνου έπειτα από γεύμα. Ο μηχανισμός πρόσληψης και αποθήκευσης γλυκόζης από το ήπαρ περιλαμβάνει α) την απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του ήπατος εμποδίζοντας τη διάσπαση του γλυκογόνου β) αύξηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης με αποτέλεσμα να ενισχύεται η πρόσληψη γλυκόζης από το αίμα προς το ήπαρ και γ) αύξηση της δραστηριότητας ενζύμων όπως η συνθετάση του γλυκογόνου με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του γλυκογόνου του ήπατος. Όταν δεν υπάρχει τροφή η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα μειώνεται με αποτέλεσμα την μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και τη διάσπαση του γλυκογόνου προς γλυκόζη που αποδίδεται προς το αίμα για τη διατήρηση της συγκέντρωσής της σε επαρκές επίπεδο.

Με την απομόνωση της ινσουλίνης από το πάγκρεας το 1922 άλλαξε ριζικά και με θετικό πρόσημο η καθημερινότητα των ασθενών με ΣΔ2. Η θεραπεία του ΣΔ1 γίνεται με χορήγηση αρκετής ινσουλίνης ώστε να αντιμετωπιστούν όσο το δυνατόν οι μεταβολικές διαταραχές. Ασθενείς με επιβαρυσμένο ΣΔ1 λαμβάνουν εσαεί και ημερησίως ινσουλίνη ώστε να αυξηθεί ο μεταβολισμός των υδατανθράκων για όλη την διάρκεια της μέρας. Στη συνέχεια χορηγούνται και πρόσθετες ποσότητες ινσουλίνης, όταν αυξάνονται τα επίπεδα της γλυκόζης μέσα στην μέρα ενδιάμεσα των γευμάτων. Έτσι η θεραπεία γίνεται εξατομικευμένα για κάθε ασθενή. Στους ασθενείς με ΣΔ2 συνίσταται η καθημερινή φυσική άσκηση σε συνδυασμό με απώλεια βάρους προς αποκατάσταση της αντίστασης των ιστών στην ινσουλίνη. Σε περίπτωση αποτυχίας γίνεται λήψη φαρμάκων που

αυξάνουν την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη ή διεγείρουν την αύξηση της σύνθεσης της ινσουλίνης από το πάγκρεας, ενώ πολλές φορές γίνεται εξωγενής λήψη ινσουλίνης.[4]



**Εικόνα 1.1:**Εξαμερές μόριο της ανθρώπινης ινσουλίνης, συμμετρική δομή, 3D απεικόνιση

[RCSB, Protein Data Bank].

### 1.2.2 ΓΛΥΚΑΓΟΝΗ

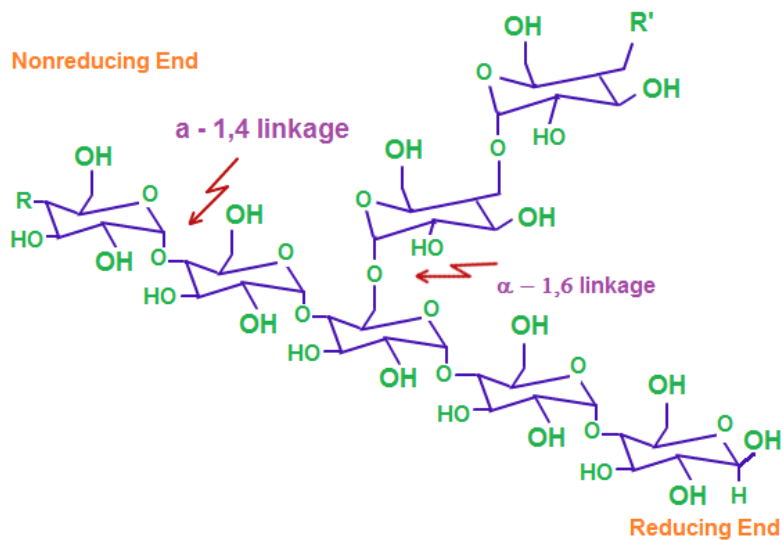
Η γλυκαγόνη είναι ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 3.485 Da και αποτελείται από αλυσίδα με 29 αμινοξέα. Είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τα άλφα κύτταρα των νησιδίων του Langerhans όταν η συγκέντρωση γλυκόζης μειώνεται στο αίμα. Έχει αντίθετη δράση από αυτήν της ινσουλίνης με κυριότερη την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα προάγοντας την γλυκογονόλυση και την νεογλυκογένεση στο ήπαρ. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται με τις παρακάτω αλυσιδωτές αντιδράσεις.

- ✦ ενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης στην μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων
- ✦ η οποία προκαλεί σχηματισμό κυκλικής AMP
- ✦ η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA)
- ✦ η οποία ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) που στη συνέχεια προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου[4]

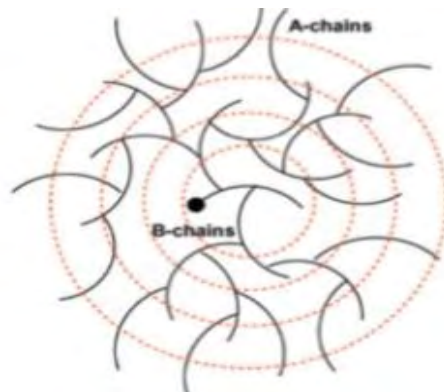
### 1.2.3 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Δομικά, είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων 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. Οι περισσότερες μονάδες γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται

με γλυκοζιτικούς δεσμούς  $\alpha$ -1,4 και ανά 10 περίπου μονάδες δημιουργείται μια διακλάδωση με έναν γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6. Το γλυκογόνο απαντά σε μεγάλες ποσότητες στα μυϊκά και ηπατικά κύτταρα, στο κυτταρόπλασμα των οποίων αποθηκεύεται με τη μορφή ένυδρων κοκκίων.



**Εικόνα 1.2:** Παρατηρούνται οι  $\alpha$ -1,4- και  $\alpha$ -1,6- γλυκοζιτικοί δεσμοί.



**Εικόνα 1.3:** Παρουσιάζεται η οργάνωση του γλυκογόνου σε εσωτερικές  $\beta$ -αλυσίδες που φέρουν κατά μέσο όρο δύο διακλαδώσεις και σε εξωτερικές  $\alpha$ -αλυσίδες που δεν έχουν διακλαδώσεις. Η μαύρη κουκίδα δηλώνει τη θέση της γλυκογονίνης.

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Άρα, ρυθμίζει την διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση στο ήπαρ είναι υψηλότερη από τους μύς (10% έναντι 2% βάρος) αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους μύς συνολικά λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους.



Στο ήπαρ, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται έτσι ώστε να διατηρείται η γλυκόζη στο αίμα, στα απαιτούμενα επίπεδα για την κάλυψη των αναγκών όλου οργανισμού. Ενώ στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των αναγκών μόνο των μύων.[6]

### **1.2.3.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

Το 1957 ο *Luis Leloir* και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη, είναι ο δότης στη βιοσύνθεση του γλυκογόνου και αποτελεί μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης. Συντίθεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) σε μία αντίδραση καταλυόμενη από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Νέες γλυκοζυλικές μονάδες προστίθενται στα κατάλοιπα των μην αναγωγικών άκρων του γλυκογόνου. Η ενεργοποιημένη γλυκοζυλική μονάδα της UDP-γλυκόζης μεταφέρεται στο υδροξύλιο του τέταρτου άνθρακα ενός άκρου του γλυκογόνου προς σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη συνθάση του γλυκογόνου. Όμως η συνθάση του γλυκογόνου προσθέτει κατάλοιπα γλυκόζης μόνο εάν η πολυσακχαρική αλυσίδα περιέχει ήδη περισσότερα από 4 κατάλοιπα. Επομένως, είναι αναγκαίος ένας εκκινητής και τον ρόλο αυτό παίζει η γλυκογονίνη όπου αυτό-γλυκοζυλιώνεται για να σχηματίσει μια πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών. 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. Ο σχηματισμός των α-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών χρειάζεται τη δράση μιας μεταφοράσης. Το ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων, όπου μεταφέρει μια αλυσίδα μορίων γλυκόζης από μια σύνδεση με δεσμό α-1,4 σε ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού του ενζύμου και στη συνέχεια από τη θέση αυτή σε μια πιο εσωτερική στο μόριο του γλυκογόνου προς σχηματισμό α-1,6.[5]

### **1.2.3.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

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, για περαιτέρω μεταβολισμό. 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 φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P). Η GP, το καθοριστικό ένζυμο στο καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο.

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6

Η φωσφορυλάση διασπά τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μέχρι και τέσσερα κατάλοιπα πριν από το σημείο της διακλάδωσης. Επειδή περίπου 1 στα 10 κατάλοιπα βρίσκονται σε διακλάδωση, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου με τη φωσφορυλάση σταματάει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά διακλάδωση.

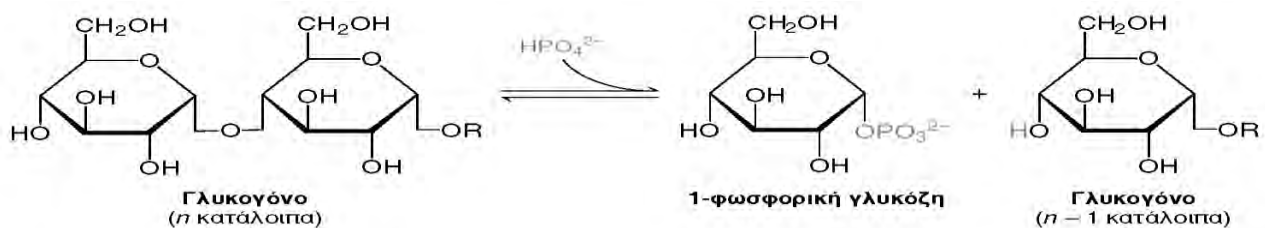
Δύο επιπλέον ένζυμα, η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, καθώς και μια μεταφοράση, τα οποία ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο για περαιτέρω αποικοδόμηση από τη φωσφορυλάση, απαιτούνται για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση μετατρέποντας τη διακλαδισμένη δομή του γλυκογόνου σε γραμμική και ανοίγει ο δρόμος ξάνα για την φωσφορυλάση για περαιτέρω διάσπαση.[6]

### 1.3 ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από την ATP σε εξειδικευμένα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνών. Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK, EC 2.7.1.38) είναι ένα δεκαεξαμερές που αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες (α4β4γ4δ4) με μια συνολική μάζα 1300 kDa. Εικόνες κρυο-ηλεκτρονιογραφίας έδειξαν ότι οι υπομονάδες είναι διατεταγμένες σε μια διμερή δομή «πεταλούδας», όπου κάθε λοβός περιέχει δύο αβγδ μονομερή. Η υπομονάδα δ (17 kDa) αποτελεί την καλμοδουλίνη και προσδίδει ενεργοποίηση της κινάσης από  $Ca^{2+}$ . Οι υπομονάδες α και β είναι ρυθμιστικές και ελέγχονται μέσω φωσφορυλίωσης, καθεμία σε ένα κατάλοιπο σερίνης από τη cAMP. Το κυκλικό AMP δεσμεύεται στις ρυθμιστικές υπομονάδες προξενώντας διάσπαση των ρυθμιστικών-καταλυτικών υπομονάδων οδηγώντας το ένζυμο σε ενεργό μορφή. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στην γ-υπομονάδα (45kDa), που περιέχει μια περιοχή κινάσης και ένα καρβοξυτελικό άκρο πρόσδεσης καλμοδουλίνης. Η ενεργός περιοχή της γ- υπομονάδας της PhK αποτελείται από δύο λοβούς. Η θέση δέσμευσης του ATP εντοπίζεται ανάμεσα στους δύο λοβούς. Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι ένα ένζυμο το οποίο τροποποιεί ομοιοπολικά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μετατρέποντας την από την GPβ στην GPα μορφή, ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα.[7]

### 1.4 Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1) κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και έτσι μπορεί να αξιοποιηθεί ως δυνητικός στόχος για σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων με βάση τη δομή, που μπορεί να είναι σχετικοί με τον έλεγχο των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο διαβήτη τύπου 2. [8] Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro* ωστόσο, το ένζυμο *in vivo* δρα μόνο προς την κατεύθυνση της φωσφορυλιτικής διάσπασης του γλυκογόνου, επειδή στο κύτταρο η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.[6]

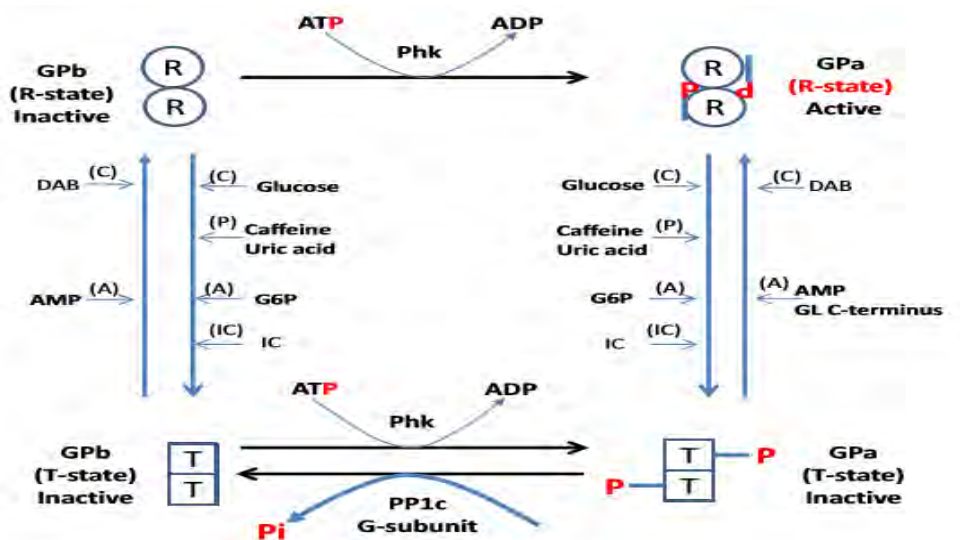


Εικόνα 1.4: Αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGB, PYGL και PYGM αντίστοιχα. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Η μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους (*rmGb*) έχει 97 % ομόλογη αμινοξική αλληλουχία με την ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση (*hmGP*), ενώ μεταξύ της *rmGP* και της ηπατικής φωσφορυλάσης (*hlGP*) δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και στα αλλοστερικά κέντρα.[8] Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης. Και οι 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με δέσμευση μεταβολιτών και με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της σερίνης 14. Η φωσφορυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που φάνηκε ότι ρυθμίζεται με ομοιοπολική φωσφορυλίωση.

Η φωσφορυλιωμένη και η απο-φωσφορυλιωμένη μορφή, ορίζονται αντιστοίχως ως *GPa* και *GPb*. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των *Monod, Changeux* και *Wyman*. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (*a* και *b*) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης *R* και μιας πολύ λίγο ενεργούς τεταμένης κατάστασης *T*, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση *a* ευνοεί την κατάσταση *R*, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση *b* ευνοεί την κατάσταση *T*. Φυσιολογικά η δραστηριότητα της *GP* ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της *GPa*. Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (*PP1*) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή *GPb*. Η φωσφορυλίωση από την *PhK* και η πρόσδεση ποικίλων αλλοστερικών ενεργοποιητών, όπως η *AMP*, μετατοπίζουν την ισορροπία στην κατάσταση *R*. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση από την *PP1* και η πρόσδεση αναστολέων, όπως η γλυκόζη, προωθούν την μετάβαση από την κατάσταση *R* στην κατάσταση *T*. Η μετάβαση από την *T* στην *R* συνδέεται με δομικές μεταβολές στις  $\alpha$ - έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο (280s) έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση *T* είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση *R* το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη.[9]

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 14 και η πρόσδεση του AMP στο αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης ευνοεί την κατάσταση R. Αυτό το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης της AMP, είναι γειτονικό της θέσης φωσφορυλίωσης και μπορεί να προσδέσει πολλούς φωσφορολυτικούς προσδέτες συμπεριλαμβανομένων της 6-φωσφορικής γλυκόζης, της 1-φωσφορικής γλυκόζης, του ATP, ADP, IMP, οι οποίοι σταθεροποιούν την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Στο καταλυτικό κέντρο της GP συνδέεται η γλυκόζη (φυσιολογικός αναστολέας) που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Το γλυκογόνο προσδένεται στο κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου και ευνοεί την R κατάσταση, ενώ στο αλλοστερικό κέντρο αναστολέων πουρίνης, που βρίσκεται κοντά το καταλυτικό κέντρο προσδένεται, καφεΐνη και άλλα ανάλογα πουρίνης όπως AMP. Οι προσδέτες σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την κατάσταση T μαζί με την γλυκόζη που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο .[10]



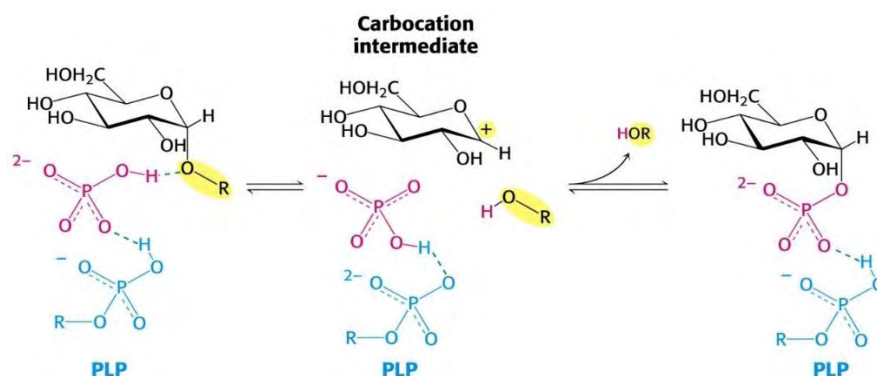
Εικόνα 1.5: Έλεγχος της φωσφορυλάσης με φωσφορυλίωση και αλλοστερικές τροποποιήσεις.

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστάση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση

της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης *a* από την κατάσταση *R* στην *T* απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. [6,14]

### 1.4.1 Ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP)

Το 1957 ανακαλύφθηκε από τον *Baranowski* πως η PLP αποτελεί ένα μέρος του καταλυτικού μηχανισμού της GP. Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του ύδατος από το ενεργό κέντρο. Τόσο το γλυκογόνο (υπόστρωμα) όσο και το προϊόν (1-φωσφορική γλυκόζη) έχουν διαμόρφωση  $\alpha$  στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση  $\alpha$  αντί για  $\beta$ , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη. Επιπλέον για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B<sub>6</sub>). Η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει μια βάση *Schiff* με μια πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 του ενζύμου. Η παρουσία αυτού του δεσμού είναι απαραίτητη για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας. [11]



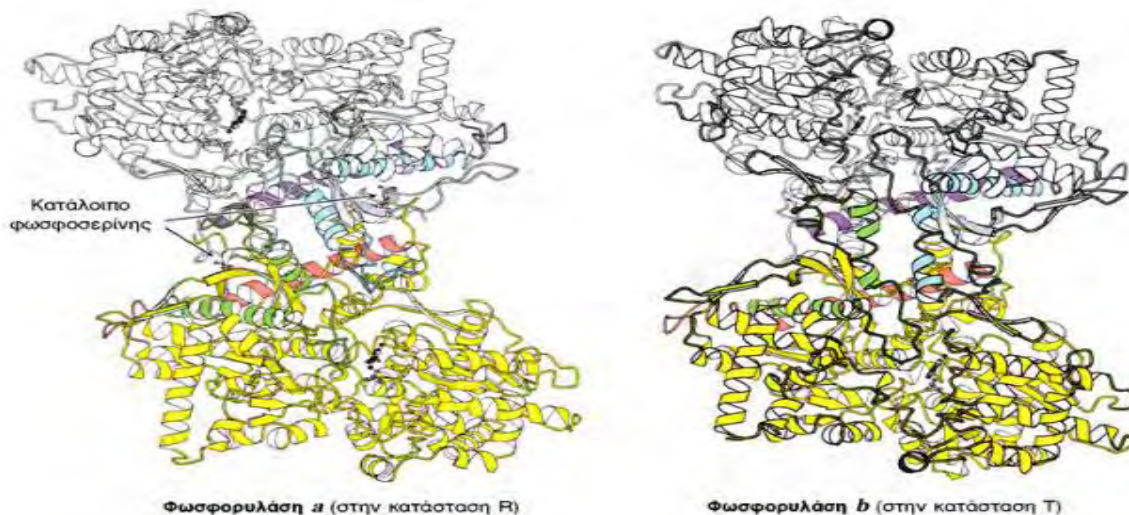
**Εικόνα 1.6:** Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα  $\text{HPO}_4^{2-}$  (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

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 [6]

#### 1.4.2 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 *kDa* (842 κατάλοιπα). Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε:

- ✦ Μία αμινοτελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπα) που περιέχει θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και χαρακτηρίζεται από πολλές ρυθμιστικές περιοχές, όπως η σερίνη 14, η οποία τροποποιείται με φωσφορυλίωση και το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης *AMP*.
- ✦ Μία καρβοξυτελική περιοχή (360 κατάλοιπα) που 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 [12]



**Εικόνα 1.7:** Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην ενεργή διαμόρφωση *R*. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο.[6]

Έχουν αναγνωρισθεί 7 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου:

- ✦ Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14
- ✦ Καταλυτικό κέντρο
- ✦ Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής)
- ✦ Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου)
- ✦ Αλλοστερικό κέντρο
- ✦ Νέο αλλοστερικό κέντρο
- ✦ Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [13]

#### 1.4.2.1 Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην *GPb*, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην *GPa* έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων.[6]

#### 1.4.2.2 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (*G1P*,



*Pi*) και αναλόγων τους (*UDP-Glc*). Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε κρυστάλλους φωσφορυλάση του γλυκογόνου που προέρχεται από μύες κουνελιών, εξαιτίας της διαθεσιμότητας και της ικανότητάς τους να παράγονται σε υψηλή ποσότητα και καθαρότητα. Το καταλυτικό κέντρο αποτελεί μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο κάθε υπομονάδας του μορίου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται ο συμπαράγοντας *PLP* και το κέντρο είναι προσβάσιμο στο διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Στην *T* διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-287. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση *T* σε *R*, ο βρόχος 282-287 (**βρόχος 280s**) εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του *Asp283* από την βασική πλευρική αλυσίδα της *Arg569* συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των *Pi* υψηλής συγγένειας.[10,14,15]

#### 1.4.2.3 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση προσδετών σε αυτό το κέντρο γίνεται κυρίως μέσω της εισαγωγής των αρωματικών 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 φυσιολογικό, 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 *van der Waals*. [13]

#### 1.4.2.4 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες (κατάλοιπα 396-418 και 420-439) και ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430-432 και 437-411). Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης. Η δομική βάση της πρόσδεσης περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Ser429*, *Lys473* και *Asn407*, καθώς και αλληλεπιδράσεις με μόρια ύδατος με τα κατάλοιπα *Gln401*, *Arg426*, *Val431* και *Gln433*. [13]

#### 1.4.2.5 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (*AMP, IMP, G1P*), είτε αναστέλλουν (*ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH*, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας της GPb που προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο ( $K_d=20-70 \mu\text{M}$  για την GPb,  $K_d=1700 \mu\text{M}$  για την GPα). Το AMP είναι ο αλλοστερικός ενεργοποιητής και συνδέεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. 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.[13]

#### 1.4.2.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Η κεντρική κοιλότητα του νέου αλλοστερικού κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα της περιοχής cap' και α2 έλικες (*Arg33, His34, Arg60* και *Asp61* και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και το άλλο άκρο από τον α7 πύργο 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. Οι αναστολείς που προσδέονται λειτουργούν σαν κλασσικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T (ανενεργός) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη.[13]

#### 1.4.2.7 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Βρέθηκε ότι η κερσετίνη προσδέεται σε ένα νέο κέντρο το οποίο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης είναι μία ρηχή αυλάκωση που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα *Lys544, Arg551, Lys665* και *Tyr548* της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα *Glu120* και *Glu123* της N-περιοχής. Φαίνεται ότι η πρόσδεση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο ευνοεί την λιγότερο ενεργό κατάσταση T μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης ενός βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T παρέχοντας μια δομική εξήγηση για το ανασταλτική δραστηριότητα της κερσετίνης.[13]

#### 1.4.3 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.[14]

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.[15]

Η μελέτη της αναστολής της *GP* αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της βιοχημείας, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας. 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. 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.[16,17]

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, έχουν 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*. [18]

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 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  $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$ .

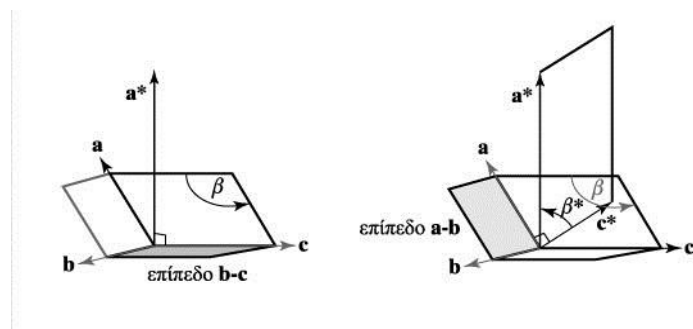


*Εικόνα 1.8:* Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: καταλυτικό κέντρο, κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου, αλλοστερικό κέντρο, νέο αλλοστερικό κέντρο, κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, κέντρο αναστολής, βρόχος 280s και η Ser14.

## 1.5 Κρυσταλλογραφία

### 1.5.1 Δομή του κρυστάλλου

Οι κρύσταλλοι δημιουργούνται μέσω της επανάληψης με απλή μετάθεση (δηλαδή χωρίς περιστροφή) ενός βασικού μοτίβου που έχει το σχήμα ενός παραλληλεπίπεδου το οποίο ονομάζεται **στοιχειώδης κυψελίδα**. Διαδοχικές κυψελίδες (στον τρισδιάστατο χώρο) είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες τόσο σε διαστάσεις όσο και σε περιεχόμενα πακετάρονται και συγκροτούν το μακροσκοπικό αντικείμενο που ονομάζεται “κρύσταλλος”. Η στοιχειώδης κυψελίδα μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα από ένα μόρια.



**Εικόνα 1.9:** Κατασκευή μιας μοναδιαίας κυψελίδας του αντίστροφου χώρου (αντίστροφη μοναδιαία κυψελίδα) από μία μοναδιαία κυψελίδα του πραγματικού χώρου [Kensal E. van Holde].

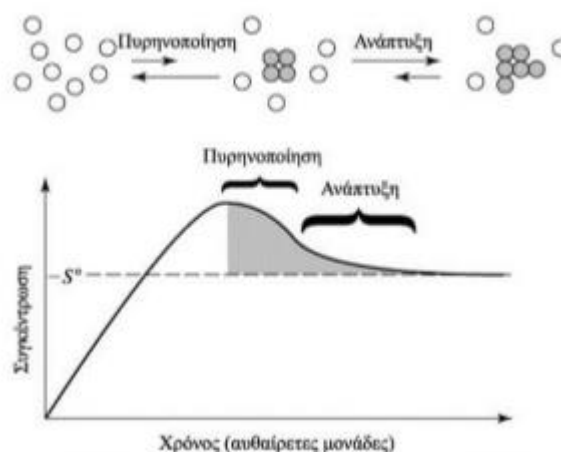
Σε ένα κρύσταλλο, η μοριακή οντότητα που αντιστοιχεί στο επίπεδο χωρίς καμία συμμετρία, καλείται **ασύμμετρη μονάδα**. Αρχίζοντας από την ασύμμετρη μονάδα μπορούν να εφαρμοστούν πράξεις περιστροφής και ελικώσεως (δηλαδή μετατόπισης και στροφής), για να κατασκευαστεί το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος. 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. Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο, κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-Χ, έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας. [20]

### 1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό, αλλά τα μακρομόρια υπάρχουν συνήθως σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια για την 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  $S^0$  ( η  $S^0$  δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά 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 μέρος 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 τροποποιώντας το διαλύτη (με αύξηση ή μείωση της ιοντικής ισχύς του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολυηλεκτρολυτών όπως πολυπεπτίδια 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 διαπύδωση, 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. Η πιθανότητα η πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο ή αντιθέτως ένα περιττό άμορφο στερεό εξαρτάται από μία σειρά πολλών παραμέτρων συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, της θερμοκρασίας, του  $pH$  και της ιοντικής ισχύος. Η εύρεση των συγκεκριμένων συνθηκών για την παραγωγή κρυστάλλων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, απαιτεί συνήθως αρκετές δοκιμές. Επίσης, το προς κρυστάλλωση δείγμα θα πρέπει να έχει περισσότερη από 95 % βιοχημική καθαρότητα για να παράγει έναν κρύσταλλο, δηλαδή κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο βήματα:

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



**Εικόνα 1.10:** 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  $S^0$  [21].

Το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή

αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η πυρηνοποίηση, δηλαδή ο σχηματισμός εναρκτήριων μοριακών συμπλεγμάτων από τα οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι, αποτελεί το σημαντικότερο από τα δύο βήματα που αναφέρθηκαν. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, τότε ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Επομένως, πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο. [20]

### **1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ**

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-Χ 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-Χ. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε έναν δεδομένο όγκο του χώρου (η πυκνότητα των ηλεκτρονίων) καθορίζει, πόσο έντονα ένα άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-Χ. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της περίθλασης. Στην περίθλαση των ακτίνων-Χ, αντιμετωπίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως κύμα. 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-Χ από ένα κρύσταλλο. Η σκέδαση αναφέρεται απλά στην ικανότητα των αντικειμένων να αλλάζουν την κατεύθυνση ενός κύματος. Στην περίπτωση του

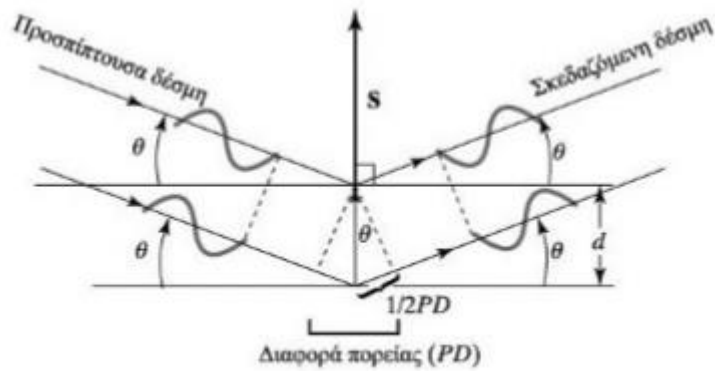
ορατού φωτός, το απλούστερο παράδειγμα είναι η ανάκλαση από ένα κάτοπτρο. Το κάτοπτρο αλλάζει απλώς την κατεύθυνση των φωτεινών κυμάτων. Μη ανακλώντα αντικείμενα μπορούν επίσης να σκεδάσουν τα φωτεινά κύματα. Ένα αντικείμενο που τοποθετείται στην πορεία μια φωτεινής δέσμης, προερχόμενης από μια σημειακή 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 επαφόμενες 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. [20]

#### 1.5.4 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 θα απλοποιηθεί το εννοιολογικό μοντέλο της περίθλασης, θεωρώντας τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος ως παράλληλα επίπεδα. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις  $d$ . Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων-Χ (με μήκος κύματος  $\lambda$ ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία  $\theta$ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδάζει το κύμα υπό την ίδια γωνία. Δεδομένου, ότι η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του  $d$ , οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Έχοντας ένα μεγάλο αριθμό επιπέδων, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή μόνο όταν τα ανακλώμενα κύματα είναι ακριβώς εν φάσει (κορυφές κυμάτων που ευθυγραμμίζονται με κορυφές, κόμβοι με κόμβους, και κοιλάδες με κοιλάδες). Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται, μόνο όταν η διαφορά μεταξύ του μήκους διαδρομής του προσπίπτοντος και του ανακλώμενου κύματος,  $PD$ , είναι ίση με ακέραιο ( $n$ ) πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ακτίνων-Χ.



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



**Εικόνα 1.11 :** Ο νόμος του Bragg για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία  $\theta$  και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ συμβαίνει, όταν η διαφορά πορείας  $PD$  μεταξύ των ανακλώμενων δεσμών από διαδοχικά επίπεδα (σε απόσταση  $d$  μεταξύ τους) είναι ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Το διάνυσμα σκέδασης  $S$  είναι κάθετο στα ανακλώντα επίπεδα και το μέτρο του είναι ίσο με το αντίστροφο της απόστασης μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης. [21]

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

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

ή

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

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 στοιχείο 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 ( $\theta$ ) 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. [20]

### 1.5.5 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλαχθεί, εκτός και εάν πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νέων κρυστάλλων και συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Θα μπορούσαν απλά να προσαρμόσουν το μοντέλο οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονιακής 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,  $\mathbf{F(S)}_{calc}$ . Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο επηρεάζει έντονα τους χάρτες Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  (ή παράγοντας  $R$ )

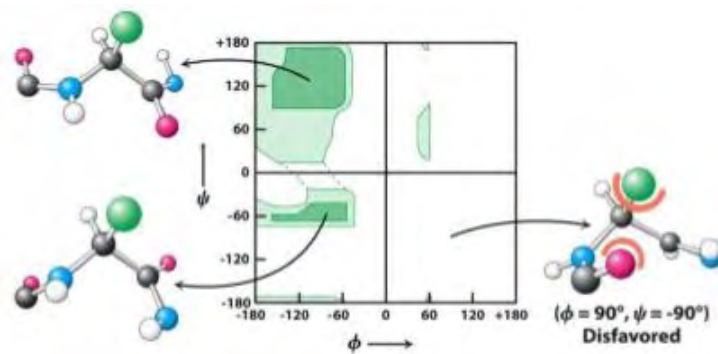
$$R = \frac{\sum | |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}| |}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

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 καλύτερο. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο σχηματισμού μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων, πρέπει να ορισθεί με ακρίβεια η δομή του μακρομορίου μαζί με ένα μεγάλο ποσοστό του διαλύτη. Δυστυχώς, ένας χαμηλός παράγοντας  $R$  μπορεί να επιτευχθεί τεχνικά και για ένα ανακριβές μοντέλο, προσθέτοντας απλώς περισσότερο διαλύτη για να καλυφθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε διάφορα μέρη της μοναδιαίας κυψελίδας. Έτσι, η επίλυση της δομής ενός μακρομορίου από τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων-Χ εξαρτάται πολύ από την κατασκευή αλλά και από την ποιότητα των μοριακών μοντέλων. Στη διαδικασία αυτή, υπάρχει ένας αριθμός βημάτων, όπου μπορεί να παρεισφρήσει η υποκειμενική προτίμηση. Ευτυχώς, είναι διαθέσιμα

διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκυπτόντων μοντέλων. Πρόσφατα, οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρία αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται τώρα 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  $R$  (Εξίσωση 6) 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 ό,τι τα δεδομένα επιτρέπουν). [20]

### 1.5.6 Διάγραμμα Ramachandran

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, απαιτείται έλεγχος του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο *N. G. Ramachandran*, διαπίστωσε ότι πολλοί συνδυασμοί  $\phi$  και  $\psi$  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*. [20]



**Εικόνα 1.12** : Ένα διάγραμμα Ramachandran που δείχνει τις γωνίες  $\phi$  και  $\psi$ . Οι τιμές  $\phi$  και  $\psi$  είναι περιορισμένες λόγω των συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι επιτρεπτές τιμές  $\phi$  και  $\psi$  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. [20]

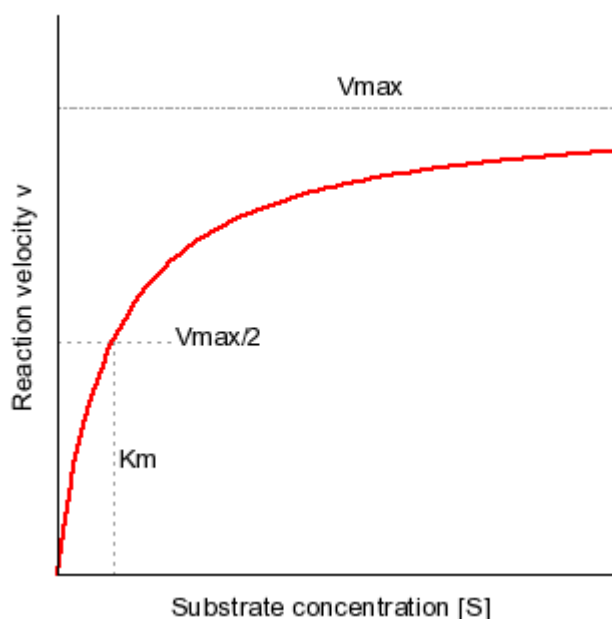
## 1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες επειδή έχουν την ικανότητα να προάγουν ειδικές χημικές αντιδράσεις κάτω από τις ήπιες συνθήκες που επικρατούν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα δεν αλλάζουν τη θέση της ισορροπίας σε μια αντιστρεπτή αντίδραση, αλλά ως καταλύτες επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται κατά την μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν, με το να διευκολύνουν τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα παρουσιάζουν διαφόρων βαθμών εξειδίκευση προς το αντιδρών (υπόστρωμα). Για να δράσουν τα ένζυμα, πρέπει το υπόστρωμα να συνδεθεί αντιστρεπτά σε περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο έχει κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να ταιριάζει στη διαμόρφωση του υποστρώματος (σχέση κλειδιού-κλειδαριάς). Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), υφίσταται μια καταλυτική αντίδραση, που προάγεται από ειδικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος (P). Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και του ενζύμου. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται ή ενεργοποιείται από την παρουσία διαφόρων χημικών ενώσεων (αναστολείς ή ενεργοποιητές). Η αναστολή διακρίνεται στην αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή αναστολή. Η αντιστρεπτή αναστολή μπορεί να είναι συναγωνιστική ή μη συναγωνιστική αναστολή. Τα κύτταρα ρυθμίζουν τη λειτουργία των ενζύμων ώστε αυτά να λειτουργούν μόνο όταν είναι απαραίτητο. Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων περιγράφεται από το μοντέλο *Michaelis-Menten*. [19]

Το 1913, ο *Lionor Michaelis* και η *Maud Menten* πρότειναν ένα μοντέλο, το μοντέλο *Michaelis – Menten*, το οποίο εξηγεί τα κινητικά χαρακτηριστικά πολλών ενζύμων. Η κινητική των ενζυμικών

αντιδράσεων, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ασχολείται με την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου,  $V_{max}$  και  $K_M$ , και με την μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Μέσα από την κλασική πλέον δημοσίευση έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Το μοντέλο που προτάθηκε είναι: 
$$S + E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} P + E$$



**Εικόνα 1.13** : Διάγραμμα της ταχύτητας  $V_0$  μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική *Michaelis-Menten*, όπου δείχνεται ότι η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}/2$ .

Όπου:

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

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Για να απλοποιηθούν τα πράγματα χρησιμοποιείται η υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης (*steady state*). Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων, στην περίπτωση αυτή το ES, παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Η **ταχύτητα (V)** ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος (S) που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων (P) που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου ( $V = -d[S]/dt = d[P]/dt$ ) και υπολογίζεται από την εξίσωση *Michaelis – Menten*. Η γραφική παράσταση της εξίσωσης είναι μια υπερβολή.

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

Όπου **V<sub>0</sub>** η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, **[S]** η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, **V<sub>max</sub>** η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και **K<sub>M</sub>** (σταθερά Michaelis) =  $(k_2 + k_{-1}) / k_1$ .

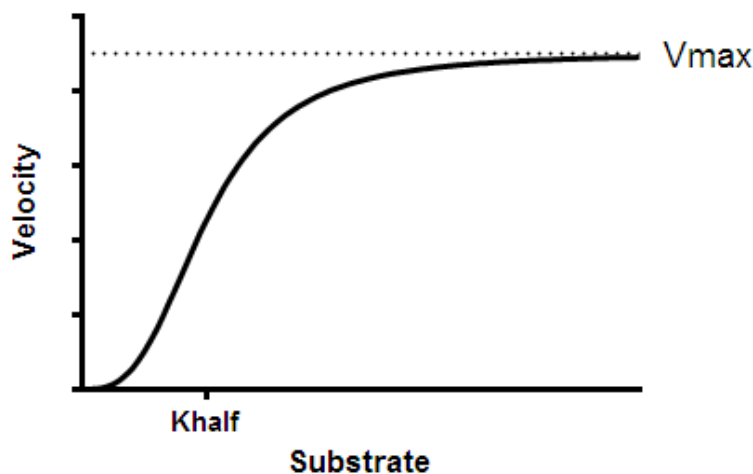
Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (S) η αρχική ταχύτητα (V<sub>0</sub>) αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις (S) όλα τα μόρια του ενζύμου είναι με τη μορφή συμπλόκου (κορεσμός) η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος και η ταχύτητα τείνει στη μέγιστη τιμή (V<sub>max</sub>).

Επισημαίνεται ότι η K<sub>M</sub> έχει μονάδες συγκέντρωσης. Είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν [S]=K<sub>M</sub>, τότε V<sub>0</sub>=V<sub>max</sub>/2. Έτσι η K<sub>M</sub> είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η [S] είναι πολύ μικρότερη από την K<sub>M</sub>, V<sub>0</sub>= (V<sub>max</sub>/K<sub>M</sub>)/[S], δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η [S] είναι πολύ μεγαλύτερη από την K<sub>M</sub>, V<sub>0</sub>=V<sub>max</sub>, δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.[6]

### 1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα

Οι κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων δεν μπορούν να εξηγηθούν με το μοντέλο *Michaelis-Menten*. Μια σημαντική ομάδα ενζύμων τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική *Michaelis-Menten* περιλαμβάνει τα αλλοστερικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα. Τα αλλοστερικά κέντρα εμφανίζουν συχνά σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης και V<sub>0</sub> σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του

υποστρώματος [S]. Σε ένα αλλοστερικό ένζυμο η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας υπομονάδας αλλάζει τη μοριακή του διαμόρφωση. Η αλλαγή αυτή μεταδίδεται στις άλλες υπομονάδες συνεργατικά και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ή μειωμένη δραστικότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Από τέτοια συνεργατικότητα προκύπτει μια σιγμοειδής γραφική παράσταση της  $V_0$  σε συνάρτηση με το [S]. Επιπλέον, η δραστικότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα και μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα. Με τον τρόπο αυτό οι καταλυτικές ιδιότητες των αλλοστερικών ενζύμων μπορούν να ρυθμιστούν για να αντιμετωπιστούν οι άμεσες ανάγκες ενός κυττάρου. Για τον λόγο αυτό, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες του κυττάρου. Η σταθερά  $K_M$  δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα.[6]



**Εικόνα 1.14** : Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

### 1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων (I) είναι συνδέτες που ενώνονται ειδικά με ένα ένζυμο με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την ικανότητα του να συνδέει το υπόστρωμα και να το μετατρέπει σε προϊόν, παρεμποδίζουν στην ουσία την ενζυμική αντίδραση

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας **μη αντιστρεπτός αναστολέας** διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι πολύ σπουδαία φάρμακα.

Η **αντιστρεπτή αναστολή**, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ένας αντιστρεπτός αναστολέας μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:  $E + I \leftrightarrow EI$ , όπου

♣ I : ο αναστολέας

♣ EI: σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα

Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα  $K_i$ , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI και επηρεάζει την  $K_M$  ή την  $V_{max}$  του ενζύμου με τον όρο

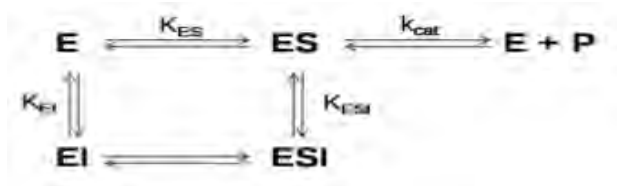
$$1 + [I]/K_i.$$

Στη **συναγωνιστική αναστολή**, ο αναστολέας (I) δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συναγωνίζεται με το υπόστρωμα (S) για δέσμευση στο ενεργό κέντρο. Ο αναστολέας αυτός καλείται συναγωνιστικός και ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της  $V_{max}$ , διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι η δράση του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της  $K_M$  μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της  $K_M$  είναι αριθμητικά ίση με: φαινομενική  $K_M = K_M (1 + [I] / K_i)$  (όπου [I] είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_i$  είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα) Καθώς αυξάνεται η τιμή [I], αυξάνεται και η τιμή  $K_M$ , αλλά η  $V_{max}$  δεν επηρεάζεται. [19].

Στη **μη-συναγωνιστική αναστολή**, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, το υπόστρωμα μπορεί να



προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Δεδομένου ότι ο αναστολέας συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτήν του υποστρώματος, η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η  $K_M$  δεν επηρεάζεται αλλά η  $V_{max}$  ελαττώνεται. [6]



**Εικόνα 1.14:** Διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα  $K_{ES}$ ,  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ , αποτελούν τις σταθερέςδιάστασης. Το  $ESI$  θεωρείται ότι είναι ανενεργό.

Για να υπολογιστούν πειραματικά οι  $K_M$  και  $V_{max}$  χρησιμοποιούνται οι καμπύλες διπλού αντιστρόφου  $1/V$  ως προς  $1/S$  των *Lineweaver-Burk*. Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* γίνεται :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V} \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Από τη γραφική παράσταση που είναι ευθεία γραμμή υπολογίζονται οι τιμές των  $K_M$  και  $V_{max}$ . Η τομή του άξονα  $y$  δίνει την τιμή  $1/V_{max}$ , ενώ η τομή στον άξονα  $x$  ισούται με  $-1/K_M$ . Η κλίση της ευθείας δίνει το  $K_M/V_{max}$

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

$$V = \frac{V_{max} S}{K_M \left(1 + \frac{1}{K_i}\right) + S} \quad \{1\} \quad \text{Όπου } [i] \text{ η συγκέντρωση του αναστολέα.}$$

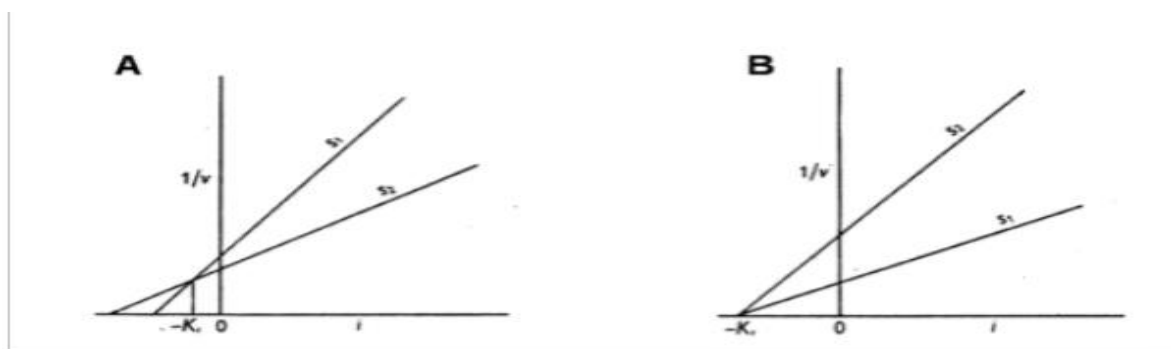
Για τον υπολογισμό της  $K_i$  υπάρχει μια απλή μέθοδος μέσω γραφικών παραστάσεων. Εάν σχεδιαστεί διάγραμμα  $1/v$  προς  $[i]$ , διατηρώντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή, παρατηρείται ότι δημιουργείται μια ευθεία γραμμή. Εάν σε ένα διάγραμμα με τον ίδιο τρόπο απεικονιστούν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι γραμμές θα τέμνονται σε ένα σημείο αριστερά του κάθετου άξονα όπως φαίνεται στην εικόνα, με το σημείο τομής στον άξονα  $x$

να προσδιορίζει την τιμή  $-K_i$ .

Κάθε γραμμή σύμφωνα με την εξίσωση {1} παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V S} + \frac{1}{V} + \frac{Km}{V S} \frac{i}{K_i}$$

{2}



**Εικόνα 1.15:** Α. Προσδιορισμός  $K_i$  σε συναγωνιστική αναστολή, Β. Προσδιορισμός  $K_i$  σε μη συναγωνιστική αναστολή. [17]

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

$$\frac{Km}{S_1} + 1 + \frac{Km}{S_1} \frac{i}{K_i} = \frac{Km}{S_2} + 1 + \frac{Km}{S_2} \frac{i}{K_i}$$

$$\text{ή} \quad \frac{1}{S_1} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) = \frac{1}{S_2} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$$

Στην μη-συναγωνιστικής αναστολή, οι γραμμές δεν διασταυρώνονται, αλλά συναντώνται σε ένα σημείο που δίνει ξανά την τιμή  $-K_i$ . Αυτό φαίνεται εύκολα ορίζοντας ότι  $1/V = 0$  στην μη-συναγωνιστική εξίσωση. Έχουμε επομένως :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{Km}{S}\right) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$$

[21]

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
Acetic acid (CH <sub>3</sub> 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
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 <sub>2</sub> )	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 <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
Kanamycin	
KHCO <sub>3</sub>	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> Mg	Applichem
Magnesium Chloride anhydrous (MgCl <sub>2</sub> )	Alfa Aesar
Manganese (II) Chloride (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma
Methanol	Scharleu
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Scharleu
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
-------------------	-------

## 2.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

ΟΡΓΑΝΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 30.000 cutoff	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10.000 cutoff	Sartorius Stedim
Φυγόκεντρος - Z36HK	Hermle
Φωτόμετρο	VWR

## 2.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies
<b>Πλασμίδια</b>	

hIGP pETM-11_hIGp	Eurofin
-------------------	---------

## 2.4 ΣΤΗΛΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΣΤΗΛΕΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
His-Trap (Ni <sup>2+</sup> Sepharose) υψηλής απόδοσης (HP)	GE Healthcare
<b>Στήλες Ιοανταλλαγής</b>	
Resource Q	GE Healthcare

## 2.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μεσολάβηση πλασμιδίου που οδηγεί στην εισαγωγή εξωγενούς DNA πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα καλείται μετασχηματισμός. Η ανάπτυξη συστημάτων μετασχηματισμού περιλαμβάνει 4 τρόπους: ηλεκτροδιάτρηση, η βαλλιστική μέθοδος, ο μετασχηματισμός με υπερήχους και ο χημικός μετασχηματισμός.[22]

### 2.5.1 ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Έχουν καθοριστεί πολλές χημικές μέθοδοι προκαλούν μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος μετασχηματισμού σήμερα είναι η επεξεργασία με  $CaCl_2$  και πολυαιθυλική γλυκόλη (PEG).

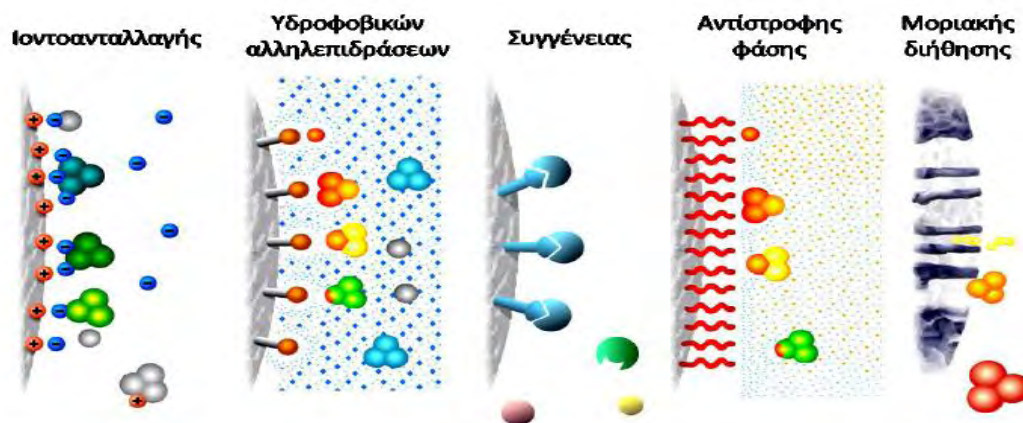
Το εναιώρημα (100  $\mu$ L) των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων τοποθετείται στον πάγο, για μερικά λεπτά, μέχρι να ξεπαγώσει. Αμέσως μόλις ξεπαγώσει, προστίθενται σε αυτό 1-50 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Τα βακτήρια υποβάλλονται σε σύντομο θερμικό σοκ, σε θερμοκρασία 42 °C, για 45 δευτερόλεπτα. Η αλλαγή στη θερμοκρασία αυξάνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει εντός του κυττάρου. Το δείγμα τοποθετείται άμεσα στον πάγο και επώαζεται για 2 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 0.9 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB-Broth, το οποίο είναι προθερμασμένο σε θερμοκρασία 37 °C και ακολουθεί επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση (210 rpm). Τέλος, 50 και 150  $\mu$ L των κυττάρων επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB Άγαρ, στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό Καναμικίνη (τελικής συγκέντρωσης 20 $\mu$ g/mL). Τα τρυβλία επώαζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 16 ώρες.[22]

## 2.6 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΣΥΣΤΗΜΑ FPLC

Ο όρος χρωματογραφία προέρχεται από τις λέξεις «χρώμα» και «γράφειν». Η τεχνική

χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον *Tswett* το 1903 για το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών και τώρα βρίσκει εφαρμογή σε όλα τα χημικά είδη. Εξαιτίας, του μεγάλου εύρους του μεγέθους, του σχήματος και της υδροφοβικότητας που έχει βρεθεί στα βιομόρια, έχουν αναπτυχθεί πολλές χρωματογραφικές τεχνικές κατάλληλες για την κάθε περίπτωση.[23] Στην χρωματογραφία γίνεται διαχωρισμός μιγμάτων μέσου ενός πορώδους υλικού, λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετατόπισης των συστατικών τους τα οποία διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της συνάφειας των ουσιών με μια στατική φάση (στερεή ή υγρή) ή μια κινούμενη φάση (αέρια ή υγρή). [24]

Το είδος της χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται υγρές κινητές φάσεις ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (*Liquid Chromatography, LC*). Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός συμβαίνει στη στήλη που αποτελεί την στατική φάση. Ο όγκος και το σχήμα της στήλης εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται αλλά και από την χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η στατική φάση πακετάρεται στη στήλη και όσο το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση, συμβαίνει ο διαχωρισμός.[25]



*Εικόνα 2.1 : Τα κυριότερα είδη της ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών [26].*

### **2.6.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ**

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μια από τις πιο ποικίλες και ισχυρές χρωματογραφικές μεθόδους για τον καθαρισμό ενός συγκεκριμένου μορίου ή μιας ομάδας μορίων από σύνθετα μίγματα. Βασίζεται σε πολύ συγκεκριμένες βιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων, όπως αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, υποδοχέα και συνδέτη ή αντισώματος και αντιγόνου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι τυπικά αναστρέψιμες, χρησιμοποιούνται για καθαρισμό τοποθετώντας ένα από τα αλληλεπιδρώντα μόρια, που αναφέρονται ως υποκαταστάτες συγγένειας, σε μια στερεή μήτρα για να δημιουργηθεί μία στατική φάση ενώ το μόριο στόχος είναι στην κινητή φάση. Ο επιτυχής καθαρισμός απαιτεί έναν ορισμένο βαθμό γνώσης και κατανόησης

της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μορίου στόχου και του συνδέτη για να βοηθήσει στον προσδιορισμό της επιλογής της κατάλληλης διαδικασίας καθαρισμού.

Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας εκμεταλλεύεται τη χημική συγγένεια ορισμένων πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Η στήλη παρασκευάζεται από υλικό που φέρει αυτή τη χημική ομάδα και η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει δεσμεύεται σταθερά σε αυτή, σε αντίθεση με άλλα βιομόρια που συνυπάρχουν στο διάλυμα. Στη συνέχεια εκλύεται με τη μεταβολή του  $pH$  ή της αλατότητας του περιβάλλοντος της στήλης ή με ανταγωνισμό με περίσσεια της ανταγωνιστικής χημικής ομάδας στη διαλυτή της μορφή.

#### ✦ *Εξισορρόπηση*

Το υλικό της στήλης εξισορροπείται με το επιθυμητό διάλυμα πρόσδεσης της πρωτεΐνης.

#### ✦ *Εισαγωγή δείγματος και πλύση*

Το δείγμα 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.

#### ✦ *Πλύση*

Οι μη-ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται από την στήλη με πλύση περίπου 10 όγκων στήλης.

#### ✦ *Έκλυση*

Η έκλυση γίνεται χρησιμοποιώντας είτε ανταγωνιστικό προσδέτη, είτε αλλάζοντας το  $pH$ , την ιοντική ισχύ ή την πολικότητα. Η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται σε καθαρή, συμπυκνωμένη μορφή.

#### ✦ *Αναγέννηση*

Το υλικό της στήλης επανα-εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης για επόμενη χρήση. [26]

### **2.6.1.2 Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα $Ni^{2+}$**

Μία μεγάλη κατηγορία στη χρωματογραφία συγγένειας, αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων πάνω σε σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα μέταλλα ακινητοποιούνται σε ένα μέσο χρωματογραφίας. Τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ή  $Fe^{2+}$ . Ορισμένα αμινοξέα, κυρίως η ιστοιδίνη (His) και η κυστεΐνη (Cys), σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ακινητοποιημένα μέταλλα σε τιμές  $pH$  6-8 και κυρίως η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστοιδίνη είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της στα ακινητοποιημένα μέταλλα. Η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων είναι ιδανική για την απομόνωση και τον



καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που διαθέτουν ετικέτα 6 ιστιδινών και έχουν υψηλή συγγένεια ως προς τα  $Ni^{2+}$ . Η αντίδραση δέσμευσης με την πρωτεΐνη-στόχο είναι εξαρτώμενη από το pH και η δεσμευμένη πρωτεΐνη εκλύεται συνηθέστερα με μείωση του pH και αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος ή με προσθήκη EDTA ή ιμιδαζολίου στο διάλυμα[26]

### 2.6.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και βάσει των φορτίων τους με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (*Ion Exchange Chromatography, IEC*). Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH 8.0 είναι αρνητικό, αυτή συνήθως θα δεσμευθεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν θετικά φορτισμένα ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δε θα δεσμευθεί στη στήλη αυτή. Μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος. Τα ιόντα π.χ. του νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. 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. 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).

#### ✦ Εξισορρόπηση

Αρχικά γίνεται η εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις κατάλληλες συνθήκες εκκίνησης. Με την ισορροπία, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης δεσμεύονται αντιστρεπτά με ιόντα αντίθετου φορτίου όπως χλώριο ή νάτριο. Το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος εξισορρόπησης είναι οι παράγοντες όπου θα εξασφαλίσουν ότι όταν το δείγμα φορτωθεί, οι πρωτεΐνες στόχοι θα δεσμευτούν στην στήλη και θα απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες.

#### ✦ Εισαγωγή του δείγματος και πλύση

Ο στόχος σε αυτό το βήμα είναι να δεσμευτούν τα μόρια-στόχοι και να απομακρυνθούν όλα τα μόρια που δεν έχουν συνδεθεί. Η πλύση της στήλης γίνεται με το διάλυμα εξισορρόπησης, επομένως το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το αυτό ώστε να δεσμεύσει όλες τις φορτισμένες πρωτεΐνες στόχους. Οι μη φορτισμένες πρωτεΐνες εκλύονται.

#### ✦ Έκλυση

Σε αυτό το βήμα έπειτα από την φόρτωση του δείγματος και την πλύση της στήλης με διάλυμα

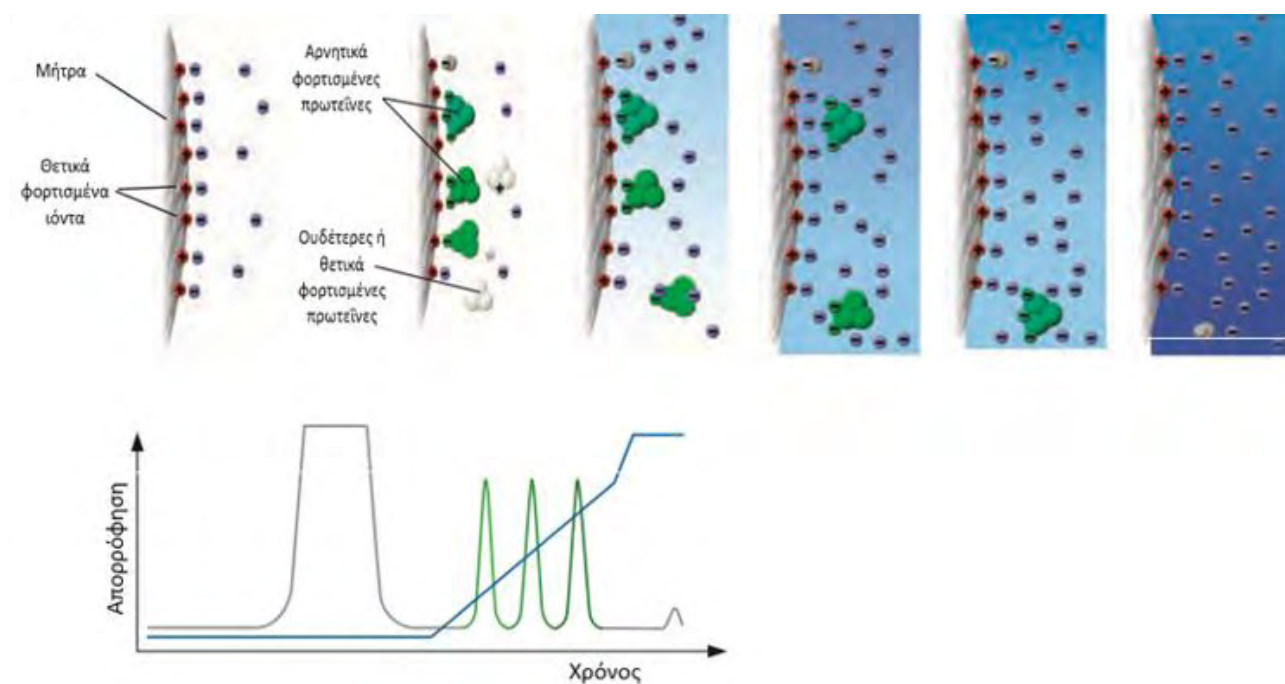
εξισορρόπησης, ακολουθεί η έκλυση των πρωτεϊνών αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος ή αλλάζοντας το  $pH$ . Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα των αλάτων (τυπικά  $Na^+$  ή  $Cl^-$ ) ανταγωνίζονται τους προσδεμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και ένα ή περισσότερα προσδεμένα συστατικά θα αρχίσουν να εκλύονται και να κινούνται προς τα κάτω στη στήλη. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο επιλεγμένο  $pH$  θα είναι οι πρώτες που εκλύονται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται και αντιστοίχως οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο στο επιλεγμένο  $pH$  θα εκλυθούν τελευταίες. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης, οι πρωτεΐνες εκλύονται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

#### ✦ Αναγέννηση

Η αναγέννηση της στήλης με τελική πλύση απομακρύνοντας ότι είναι ισχυρά προσδεμένο στη στήλη επιτρέπει στο υλικό να ανακτήσει τη δεσμευτική του ικανότητα για μελλοντική χρήση έπειτα από επανα-εξισορρόπηση.[27]

#### 2.6.2.1 ΣΤΗΛΗ 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) [27]



Εικόνα2.2: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Παράδειγμα απομόνωσης και καθαρισμού αρνητικά φορτισμένης

πρωτεΐνης. Παρατηρούμε ότι οι λιγότερο ισχυρά προσδεδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται πρώτες στα κλάσματα της έκλυσης [27].

## 2.7 ΠΡΩΤΕΑΣΗ TEV

Το μοριακό βάρος της είναι 49 *kDa* ενώ η δραστικότητα πρωτεάσης βρίσκεται στην C-τελική της περιοχή μοριακού βάρους 27 *kDa*. Η θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση TEV είναι ένας γραμμικός επίτοπος που αποτελείται από επτά υπολείμματα αμινοξέων. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση TEV είναι η *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.[28]

## 2.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Ηλεκτροφόρηση καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (*u*) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (*E* τ το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (*z*) και τον συντελεστή τριβής (*f*), όπως φαίνεται από τη σχέση:

$$U = E \cdot z / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη  $E \cdot z$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο είναι αντίθετη της δύναμης τριβής  $f \cdot u$  που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου και του μέσου. Ο συντελεστής τριβής *f* εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου, καθώς και από το ιξώδες (*η*) του μέσου. Για μια σφαιρική πρωτεΐνη ακτίνας *r* ισχύει:

$$F = 6\pi \cdot \eta \cdot r$$

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μικρά μόρια μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες.[6] Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα. Αυτό 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 πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αγαρόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 *kDa*. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι μπορούμε να καθορίσουμε

το μέγεθος των πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, και καθορίζεται επίσης από τις συνθήκες πολυμερισμού αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς, η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη, τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται, είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδένουν χρωστικές των πρωτεϊνών. Το πηκτώμα σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή. Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες (απαρχητής) όπως π.χ. το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι η N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O<sub>2</sub>, αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (*sodium dodecyl sulfate*, δωδεκάκυλο-θειικό νάτριο) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών.

**Παρασκευή πηκτής:** είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία στην συγκεκριμένη απέχουν μεταξύ τους 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*running buffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % w/v SDS*) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος ακριβώς πριν να μεταφερθούν τα διαλύματα εντός των πλακών, ώστε να μην αρχίσει ο πολυμερισμός πολύ νωρίς.

**Προετοιμασία δειγμάτων:** Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1× (10 % *glycerol*, 154 mM *Tris*, 2 % *SDS*, 0.01 % w/v, *bromophenol blue*, 1.25 % w/v, β-

*Mercaptoethanol*). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min σε θερμοκρασία 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα.

**Τοποθέτηση των δειγμάτων:** 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 παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10,00%	12%
	Επιστοιβάξης (3ml)	Διαχωρισμού (5ml)	
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	2,1	1,9	1,6
30% <i>Acrylamide-mix</i>	0,5	1,7	2.0
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1,3	1,3
Tris 1.0 M, pH 8.8	0,38	-	-
SDS (10%)	0,03	0,05	0,05
APS 10%	0,03	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002

Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του *SDS*, κινούνται προς τη θετική άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοιβάξης που έχει *pH* 6,8 (*Tris-HCl*, *pH* 6.8) το πήκτωμα διαχωρισμού με *pH* 8,8 (*Tris HCl pH* 8,8) και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης με *pH* 8,3 (*Tris-Glycine pH* 8,3). Πρέπει να επισημανθεί ότι η γλυκίνη μπορεί να είναι θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένη, ανάλογα με το *pH*. Όταν η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων *pH* 8.3 αναγκάζονται να εισέλθουν στο πήκτωμα, όπου το *pH* είναι 6,8. Σε αυτό το περιβάλλον, η γλυκίνη μεταβαίνει κυρίως στην ουδέτερα φορτισμένη κατάσταση. Αυτή η απώλεια φορτίου τους αναγκάζει να μετακινούνται πολύ αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα *Cl<sup>-</sup>* (από το *Tris-HCl*), από την άλλη, κινούνται πολύ πιο γρήγορα στο ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του *Cl<sup>-</sup>* από το ιόν *Tris* (που κινείται τώρα προς την άνοδο) δημιουργεί μια στενή ζώνη που τραβάει τη γλυκίνη πίσω από αυτό, με αποτέλεσμα δύο στενά διαχωρισμένα

μέτωπα μεταναστευτικών ιόντων, τα οποία είναι το εξαιρετικά κινητικό μέτωπο  $\text{Cl}^-$ , ακολουθούμενο από το πιο αργό, κυρίως ουδέτερο μέτωπο γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα πηκτώματος έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που είναι ενδιάμεση της κινητικότητας της γλυκίνης και του  $\text{Cl}^-$ , και έτσι οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στη στενή ζώνη μεταξύ του  $\text{Cl}^-$  και γλυκίνης. Αυτό συνεχίζεται μέχρι να φτάσουν στο σημείο του πηκτώματος, όπου το  $\text{pH}$  είναι 8,8. Σε αυτό το  $\text{pH}$  τα μόρια γλυκίνης είναι ως επί το πλείστον αρνητικά φορτισμένα και μπορούν να μεταναστεύσουν πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες. Έτσι, το μέτωπο γλυκίνης επιταχύνει αφήνοντας πίσω του τις πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο πήκτωμα επιστοιβάξης και στο πήκτωμα διαχωρισμού και δεδομένου ότι η πηκτή διαχωρισμού έχει αυξημένη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, η οποία επιβραδύνει την κίνηση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, αρχίζει ο διαχωρισμός [29].

Τέλος έχουμε **Χρώση της πηκτής**: Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10 % v/v διάλυμα οξικού οξέως μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το οξικό και προστίθεται 0.1 % *Coomassie Blue R250*, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Τότε τοποθετούμε και πάλι την πηκτή στο φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρόνο και αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται η *Coomassie Blue* και προστίθεται ξανά διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται. Τέλος το πήκτωμα μένει με διάλυμα οξικού οξέος 10 %v/v έως ότου αποχρωματιστεί εντελώς.

## 2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ-ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Η μέθοδος *Bradford* είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στη μεταβολή της απορρόφησης της χρωστικής *Coomassie*, όταν η προηγουμένως ερυθρή μορφή του αντιδραστηρίου μετατρέπεται και σταθεροποιείται στην μπλε μορφή με την πρόσδεση της πρωτεΐνης. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου συμβαίνουν τα εξής: η ερυθρή μορφή της χρωστικής δίνει το ελεύθερο ηλεκτρόνιο της στις ιονίζουσες ομάδες της πρωτεΐνης, το οποίο προκαλεί μια διαταραχή στη μητρική κατάσταση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να εκτίθενται οι υδροφοβικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές προσδέονται μη-ομοιοπολικά στη μη-πολική περιοχή της χρωστικής μέσω αλληλεπιδράσεων *van der Waals*, τοποθετώντας τις αμινικές ομάδες της πρωτεΐνης κοντά στα αρνητικά φορτία της χρωστικής. Η πρόσδεση ενισχύεται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο μορίων. 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. Η προσδεμένη μορφή της χρωστικής έχει μέγιστο οπτικής

απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm. Η κατιοντική (ελεύθερη) μορφή είναι πράσινη ή κόκκινη, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιεί τη μπλε ανιοντική μορφή. 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 μL από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προσθέτονται 780 μL απιονισμένο ύδωρ και 200 μL αντιδραστηρίου Bradford 5x (Biorad), έτσι ώστε να γίνει 1x. Στη συνέχεια τα διαλύματα αναδεύονται και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Ακολούθως αναδεύονται και φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 595 nm, ενώ τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

## 2.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ GP ΑΠΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ ΚΟΝΙΚΛΩΝ (rmGPb)

Η απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κόνικλων έγινε με τροποποίηση της μεθόδου Fisher & Krebs (*Meth in Enzymology Vol. V, p. 369-373, 1962*). Αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοαιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

### ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- 3 αρσενικοί κόνικλοι ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*
- Διάλυμα οξικού οξέος  $CH_3COOH$  1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5 mM -διθειοθρεϊτόλης).
- Κεκορεσμένο διάλυμα  $KHCO_3$  Διάλυμα 90 % w/v  $(NH_4)_2SO_4$
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% w/v  $NaCO_3$  και 10 mM EDTA στους 100 °C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C )
- Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1 M, pH 7.0

- Ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* [τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/*HCl* 0.001 M] (*pH* 7.5)
- Διάλυμα *Tris* 2.0 M
- Διάλυμα *AMP* (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, *pH* 7.0
- Διάλυμα  $(CH_3COO)_2Mg$ , 1.0 M *pH* 7.0
- Γλυκερόλη

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Ημέρα 1η

#### 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 ομογενοποιημένος ιστός εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία.  
Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δεν ξεπέρασε τα 30 min.  
Η διαδικασία αυτή, δηλαδή ζύμωμα του ομογενοποιημένου ιστού για 10 min, πραγματοποιείται για να βγει η *GPb* από τα ζωικά κύτταρα.

Εκχύλιση 1<sup>η</sup> (10 min) 2300 mL

- a) Ομογενοποιημένος ιστός και ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- a) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- b) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 2<sup>η</sup> (10 min) 2300 mL

- a) Ομογενοποιημένος ιστός από την 1<sup>η</sup> εκχύλιση και ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- a) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- b) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 3<sup>η</sup> (10 min) 1150 mL

- a) Ομογενοποιημένος ιστός από την 2<sup>η</sup> εκχύλιση και μίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί



8 min

- a) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- b) 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  $CH_3COOH$  1 N 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*. Το εκχύλισμα τοποθετείται σωλήνες φυγοκέντρησης ισοζυγίζεται και τοποθετείται στη φυγόκεντρο.

7. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 *rcf* επί 30 *min*.

8. Διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί *Buchner* εν ψυχρώ για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Η συσκευή διήθησης αποτελείται από χωνί *Buchner*, κωνική φιάλη δύο λίτρων ή οποία πρέπει να βρίσκεται μέσα σε μία λεκάνη με πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, λαστιχάκι συνδεδεμένο με την αντλία κενού και χάρτινα φίλτρα διαμέτρου 18.5 cm. Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση δύο χάρτινων φίλτρων στο χωνί *Buchner* και τη δημιουργία κενού με την λειτουργία της αντλίας κενού. Σταδιακά μικροί όγκοι εκχύνονται από τα δοχεία της φυγοκέντρου στο χωνί *Buchner*. Τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί *Buchner*. Όταν ο όγκος του διαλύματος μέσα στην φιάλη γίνει περίπου 1.5 lt αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την κωνική φιάλη με την αντλία κενού ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο όγκος του υγρού μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο και φυλάσσεται σε δοχείο των 20 L εν ψυχρώ. Η διήθηση με τη χρήση της συσκευής *Buchner* συνεχίζεται για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος.

9. Ρύθμιση του  $pH$  του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος  $KHCO_3$ . {συλλέγεται το δείγμα 1ο}

### 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. (Αντί για όλη τη νύχτα μπορούμε να αφήσουμε το δείγμα στον ψυκτικό θάλαμο για 2 μέρες ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός)
14. 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα.

### **Ημέρα 2<sup>η</sup>**

1. Κόβουμε τη μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε.
2. Ζυγίζουμε 6.5 g  $Na_2CO_3$  και 2.44 g  $EDTA$  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  $H_2O$ .
5. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται σε απιονισμένο  $H_2O$  και αφήνονται να βράσουν για 30 min.
6. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C.

### 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 φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον

ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου.

4. 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. (συλλέγεται το δείγμα 2 πριν τη διαπίδυση)

### Ημέρα 3<sup>η</sup>

#### A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

1. Συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά τη διαπίδυση σε ογκομετρικό κύλινδρο.
2. Διαύγαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με φυγοκέντρηση στις 34.540 rcf για 15 min (0 – 4 °C).
3. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου υγρού (συλλέγεται το 3ο δείγμα).
4. Προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } 0.3 \text{ M } 2\text{-μερκαπτοαιθανόλης} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 3/27 = 13.1 \text{ mL}$$

$$11.8 \text{ mL} + 13.1 \text{ mL} = 131.1 \text{ mL}$$

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

$$\text{Όγκος } EDTA \text{ } 0.1 \text{ M} = \text{πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος } 0.3 \text{ M } 2\text{-μερκαπτοαιθανόλης} \times 5/1000 = 131.1 \text{ mL} \times 5/1000 = 0,656 \text{ mL} \text{ ή } 656 \text{ }\mu\text{L}$$

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 σε θερμοκρασία 37 °C επί 1 ώρα 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  $CH_3COOH$  1 N.
9. Διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

#### Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

10. Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση ογκομετρείται (συλλέγεται το 4ο δείγμα).
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  $(CH_3COO)_2Mg$ , pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος  $(CH_3COO)_2Mg$ , pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3 mL

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

#### Ημέρα 4<sup>η</sup>

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

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

3. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min (25-30 °C).

4. Το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται

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

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

7. Προσθήκη διαλύματος  $(CH_3COO)_2Mg$ , pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος  $(CH_3COO)_2Mg$ , pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3 mL

8. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά δοχεία φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες (Συμβαίνει η 1η ανακρυστάλλωση και συλλέγεται το 5ο δείγμα).

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

## Ημέρα 5<sup>η</sup>

1. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση.
2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς όμως την προσθήκη AMP και  $(CH_3COO)_2Mg$ .
3. Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β ως ακολούθως: 10  $\mu$ L ενζυμικού δείγματος 2500  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 280 και 260 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

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

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ( $\epsilon$ ) για την *rmGPb* ισούται με 1.32.

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

4. Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και φυλάσσεται στους  $-20^\circ C$ .

### 2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης *hIGP*

Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PYGL*) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης *pETM-11*. 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. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους *BL21 Gold (DE3)* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Μετά το πέρας της επώασης 100  $\mu$ L της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο *LB Agar*, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμικίνη σε τελική συγκέντρωση 20  $\mu$ g/mL. Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16 ώρες σε θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37  $^\circ C$ . Το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης παρουσία των 6 ιστιδινών υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος *ProtParam* σε 6.85 και 97.97 kD αντίστοιχα. Απουσία της ετικέτας συγγένειας οι ίδιες παράμετροι υπολογίστηκαν σε 6.71 και 97.2 kD αντίστοιχως (*UniProtKB-ID P06737*). Όλες οι διαδικασίες χειρισμού βακτηριακών κυττάρων

έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επώαστηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο. Από το τρυβλίο που επιστρώθηκε με κύτταρα που μετασχηματίστηκαν, έγινε επιλογή αποικιών και εμβολιασμός κάθε αποικίας σε 50 mL *LB Broth* στο οποίο προστέθηκαν 20  $\mu$ L καναμικίνη, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο (*MnCl2*) και 100 mg/L πυριδοξίνη. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια μέρος της υγρής καλλιέργειας μεταφερθηκε 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  $\mu$ L καναμικίνη, 600 mg/L *MnCl2* και 100 mg/L πυριδοξίνη. Από το παραπάνω θρεπτικό μίγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύνουμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα, για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φωτομετρίας ( $\lambda=600$  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 τοποθετήθηκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, *IPTG*, σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM στην υγρή καλλιέργεια. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχόμενο ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 18 °C, 210 rpm για 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση 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  $\beta$ -GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0 και 0.5 mM PMSF. Το PMSF προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 10 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο ως εξής: *amplitude* 70 %, 30 sec εφαρμογή υπερήχων /30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση για 1h:30min, 4 °C, σε 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45  $\mu$ m 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  $\mu$ m και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

#### Πρώτο βήμα:

IMAC με ακινητοποιημένα  $Ni^{2+}$  σε σφαιρίδια σεφαρόζης (*His-Trap*, *GE Healthcare*): Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM  $\beta$ -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 0.5 Imidazole pH 7.0 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM DTT υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C για 16 ώρες. Η διαπίδυση έγινε για να απομακρυνθεί το αλάτι, ώστε το δείγμα να μπορέσει να προσδεθεί στη δεύτερη στήλη, τη στήλη ιοντοανταλλαγής.

#### Δεύτερο βήμα:

Στήλη ιοντοανταλλαγής Resource Q (GE, HealthCare): Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο pH 8.0 η hIGPα έχει αρνητικό φορτίο και ως εκ τούτου μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως η στήλη Resource Q. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 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 Cl (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 προσδεμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Τέλος, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά που περιείχαν τη hIGP σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 30000 Daltons, με φυγοκέντρηση ώστε να γίνει στη συνέχεια φωσφορυλίωση από την γ καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης από μυϊκό ιστό κονίκλων (rmPhK-άσης απ). 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 Ni<sup>2+</sup> σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare): Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 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 έκλουση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιέχει 20 mM *Tris-HCl* pH 8.0, 0.5 M *NaCl*, 0.5 M *imidazole* (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με *SDS-PAGE* και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη και συμπυκνώθηκαν. Ακολούθησε προσδιορισμός της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης και έγινε προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης (50 % τελική συγκέντρωση) και αποθήκευσης της σε θερμοκρασία -20 °C.

## 2.12 Φωσφορυλίωση της GP

Η φωσφορυλίωση της GP γίνεται, από την PhK και συγκεκριμένα από την γ-καταλυτική της υπομονάδα στη Ser14 της GP. Η φωσφορυλίωση της hIGPb που απομονώθηκε παραπάνω έγινε παρουσία:

- ♣ Ρυθμιστικού διαλύματος 1X HEPES buffer pH 8.2 (mix)
- ♣ 1 mM ATP
- ♣ 16 ng/mL rmPhK-γ-trunc.

Με υπολογισμούς διαπιστώθηκε πώς ο ελάχιστος όγκος που απαιτείται για την φωσφορυλίωση είναι 120 µL, ώστε στο διάλυμα φωσφορυλίωσης οι συγκεντρώσεις να είναι 1x HEPES buffer (mix) pH 8.2, 1 mM ATP, 16 ng/mL rmPhK-γ-trunc. Η rmPhK-γ-trunc (0,9 mg/mL), αραιώθηκε με 1x HEPES buffer (mix) pH 8.2 και 5 mg/mL BSA για να επιτευχθεί συγκέντρωση 16 ng/mL στο διάλυμα φωσφορυλίωσης. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για περίπου 90 λεπτά στο σκοτάδι και έπειτα ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο και τη προσθήκη διαλύματος TEA pH 6.8.

## 2.13 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στο πειραματικό μέρος, πραγματοποιήσαμε *in vitro* την αντίθετη αντίδραση. Δηλαδή παρουσία του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (Pi)



τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.



Οι χημικές ενώσεις που μελετήθηκαν αποτελούν ανάλογα γλυκόζης. Οι κινητικές μελέτες έγιναν έναντι της *hIGPa*. Οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι **KS511** και **KS512**.



**Εικόνα 2.3** : Οι χημικές δομές των αναστολέων A) **KS512** και B) **KS511**

### 2.13.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηκότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης.

#### **Παρασκευή των διαλυμάτων φωτομέτρησης:**

- ✦ Μίγμα διαλύματος μολυβδαινίου (15 mM) και οξικού ψευδάργυρου (100 mM), σε pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό HCl 10 N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο και μακριά από το φως.
- ✦ Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10 % (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10 N. Ομοίως γίνεται αποθήκευση σε σκουρόχρωμο δοχείο.

\*Τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα.

Γίνεται ανάμιξη με αναλογία όγκου 4:1 αντιδραστήριου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα αφήνεται (επίσης μακριά από το φως) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά από την παρασκευή του έως ότου σχηματιστεί μια ετερόχρωμη ένωση.

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 500 μL, από το διάλυμα φωτομέτρησης. Μετά από ανάμιξη τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία

30° C για 15 min. Το ορθοφωσφορικό ιόν σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία  $Zn^{2+}$  σε pH 5 το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ, και έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Επίσης γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα ορθοφωσφορικών ιόντων (πρότυπο), για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε κάθε δείγμα.[31]

### 2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση 5  $\mu g/mL$  για την *hIGPa*, 1 % w/v γλυκογόνο σε όγκο 240  $\mu L$  ώστε στον όγκο της αντίδρασης (180  $\mu L$ ) να υπάρχει 1  $\mu g/mL$  *hIGPa* και 0.2 % w/v γλυκογόνο

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

Παρασκευάσαμε τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης :

Assay Buffer 1	Assay Buffer 2
400 mM KCl	270 mM KCl
200 mM imidazole	135 mM Imidazole
4 mM DTT	2.7 mM DTT
4 mM EDTA	2.7 mM EDTA

Στο *Assay Buffer 2* βρίσκονται οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μελετάμε και προκύπτει από αραιώση του *Assay Buffer 1*.

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  $\mu L$ . Από το διάλυμα των 400 mM παρασκευάσαμε *G1P* με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P 400 mM 788 $\mu L$	G1P 90 mM
dH <sub>2</sub> O 350 $\mu L$	
Assay Buffer 1 2362 $\mu L$	Assay Buffer 2
<b>Ντελ= 3500 <math>\mu L</math></b>	

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 1200 μL Assay buffer 2800 μL	G1P 27 mM Vτελ= 500 μL	6
G1P 90 mM 800μL Assay buffer 3200 μL	G1P 18 mM Vτελ= 4000 μL	4
G1P 27 mM 600 μL Assay buffer 3400 μL	G1P 13.5 mM Vτελ= 4000 μL	3
G1P 90 mM 400 μL Assay buffer 3600 μL	G1P 9 mM Vτελ= 4000 μL	2
G1P 9 mM 200 μL Assay buffer 3800 μL	G1P 4.5 mM Vτελ= 4000 μL	1

Τοποθετήσαμε τα υποστρώματα για επώαση για 30 min σε θερμοκρασία 30°C όταν έχουν περάσει 12 min από την στιγμή που τοποθετήσαμε για επώαση στους 30 °C το ενζυμικό διάλυμα.

### 2.13.3 Υποστρώματα hIGPa

#### Παρασκευή υποστρωμάτων για την $K_M$

<b>G1P (από stock, mM)</b>	40 μL (4.5mM)	40 μL (9mM)	40 μL (13.5mM)	40 μL (18 mM)	40 μL (27mM)
<b>dH<sub>2</sub>O μL</b>	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL
<b>100% DMSO</b>	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL
<b>Vτελ</b>	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL

### Παρασκευή υποστρωμάτων για την $K_{mapp}$

G1P (από stock mM)	40 $\mu$ L (4.5mM)	40 $\mu$ L (9mM)	40 $\mu$ L (13.5mM)	40 $\mu$ L (18 mM)	40 $\mu$ L (27mM)
dH <sub>2</sub> O $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L
Inhibitor (100% DMSO)	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L
Ντελ	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

### Προσδιορισμός της $K_M$

Λαμβάνουμε 36  $\mu$ L από το ενζυμικό μας διάλυμα και προστίθενται στο πρώτο διάλυμα των υποστρωμάτων. Αυτή η χρονική στιγμή ορίζεται ως  $t=0$ , και ξεκινάει η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης 180  $\mu$ L. Οι συγκεντρώσεις της G1P είναι 1, 2, 3, 4, 6 mM. Συνεχίζουμε το πείραμα παίρνοντας 40  $\mu$ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5 λεπτά τοποθετώντας τα σε 10  $\mu$ L SDS 1 % w/v και κάνοντας έντονη ανάδευση με αποτέλεσμα το πέρας της αντίδρασης. Στο τέλος της διαδικασίας τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C.

### Προσδιορισμός της $K_{mapp}$

Για τον προσδιορισμό των  $K_{mapp}$  η συγκέντρωση του αναστολέα παρέμενε σταθερή.

### Προσδιορισμός της $K_i$

Ο προσδιορισμός της  $K_i$  έγινε με τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Για τους αναστολείς **KS511**, **KS512** έναντι της *hIGPa*.

Παρασκευάσαμε διαλύματα, εις διπλούν, τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση.

Τυφλό H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 40 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 32 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 8 $\mu$ L ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 31.1 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 8.9 $\mu$ L G1P 6 mM
Τυφλό φωσφορικών	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 30 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 10 $\mu$ L Pi 1 mM

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφηκε. Τέλος μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 850 nm αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του dH<sub>2</sub>O.

#### 2.13.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων και παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων με πρόγραμμα GraFit.[32]

Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστικότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστικότητα ορίζεται ως τα μολ υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή  **$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$** . Για να υπολογίσουμε την ειδική δραστικότητα από τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τα μολ φωσφορικών που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM ορθοφωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων, διότι:

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

Άρα στα 1000 μL περιέχονταν 0.25 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, στα 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των ορθοφωσφορικών ιόντων που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των ορθοφωσφορικών ιόντων είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε μολ για κάθε δείγμα. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μολ ορθοφωσφορικών ιόντων που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P. Έτσι, η απορρόφηση των ορθοφωσφορικών ιόντων ισούταν με:

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

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μολ έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μολ των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

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

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

**Όπου,**  $limit = 0.78 \cdot [G1P] \cdot assay\ volume$

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  $\mu$ L) .

Και,  $f = limit / assay\ volume * C$

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

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

$v = Vmax[S] / KM + [S]$  όπου :

$v$ : ταχύτητα,  $Vmax$ : μέγιστη ταχύτητα,  $[S]$ : συγκέντρωση υποστρώματος,  $KM$ : σταθερά Michaelis-Menten

Τέλος, έγινε η καμπύλη (*non linear fit*)  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η  $K_m$  και οι  $K_{Mapp}$ , υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου *Lineweaver-Burk*. Για τον υπολογισμό της  $K_i$ , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι  $K_{Mapp}$  παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον γγ' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των  $K_{Mapp}$  και στον χχ' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (*linear fit*) υπολογίστηκε η  $K_i$  στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα χχ', το σημείο

αυτό ισούται με το  $-K_i$ . Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:  $y = ax + b$  όπου,  $a$  είναι η κλίση της ευθείας  $b$  είναι η τεταγμένη επί της αρχής.

## 2.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

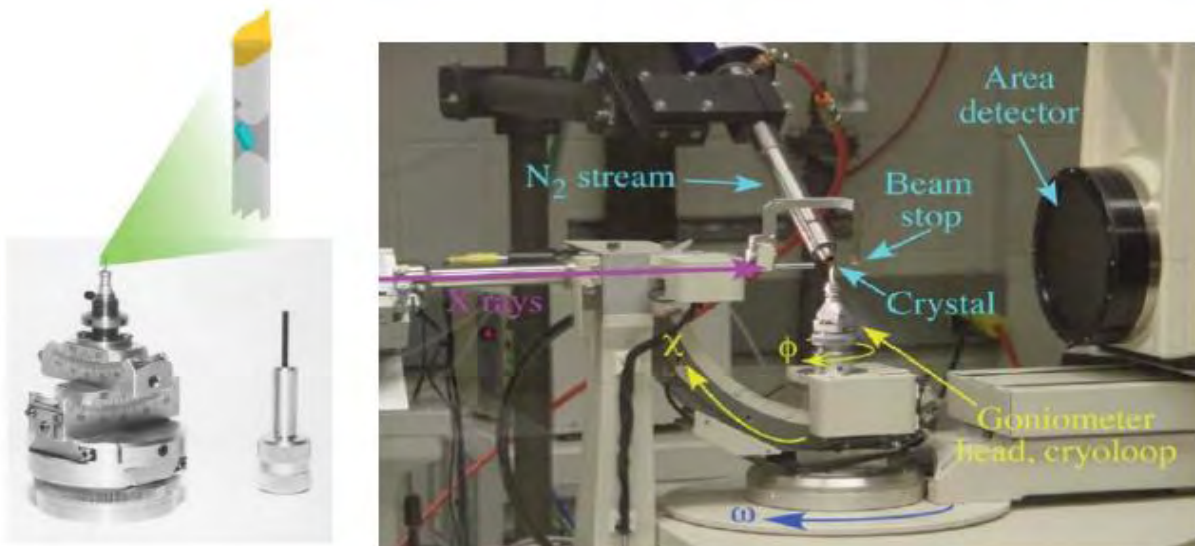
### 2.14.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

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 16 h. 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*. 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 P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) εντός γυάλινων σωλήνων.[33].

#### **2.14.2 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 εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που αποτελούταν από 1 mM BES, pH 6.7, 10 % DMSO και 1 mM αναστολέα για 3 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γωνιόμετρο και όλο το σύστημα 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 κρυστάλλου 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 2.4** :Αριστερά: πλήρης κεφαλή γωνιομέτρου, με υποδοχή τριχοειδούς 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  $\phi$  και  $\chi$  κατευθύνει πολλές ανακλάσεις προς τον ανιχνευτή. Στη διάταξη που παρουσιάζεται, οι άξονες  $\phi$ ,  $2\theta$  και  $\omega$  συμπίπτουν [34]

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας ( $\lambda$ ), 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.

### 2.14.3 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* [32, 36] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [41]. Έγιναν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα *Coot* [38, 39] και βελτιστοποίησης με το *REFMAC* [35,36]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον ηλεκτρονιακό χάρτη  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ . Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης



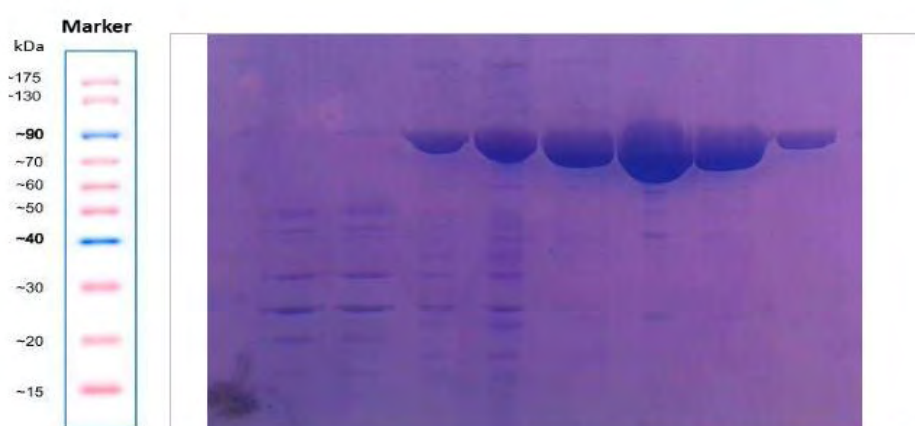
(*refinement*) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν με τη βοήθεια του προγράμματος *Ligand Builder* (που υπάρχει στο *Coot*). Τέλος, η βελτιστοποίηση των ιστροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο. Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  και  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ , στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4 [37]. 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 [40].

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

#### 3.1.1 Απομόνωση και καθαρισμός της rmGPb

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



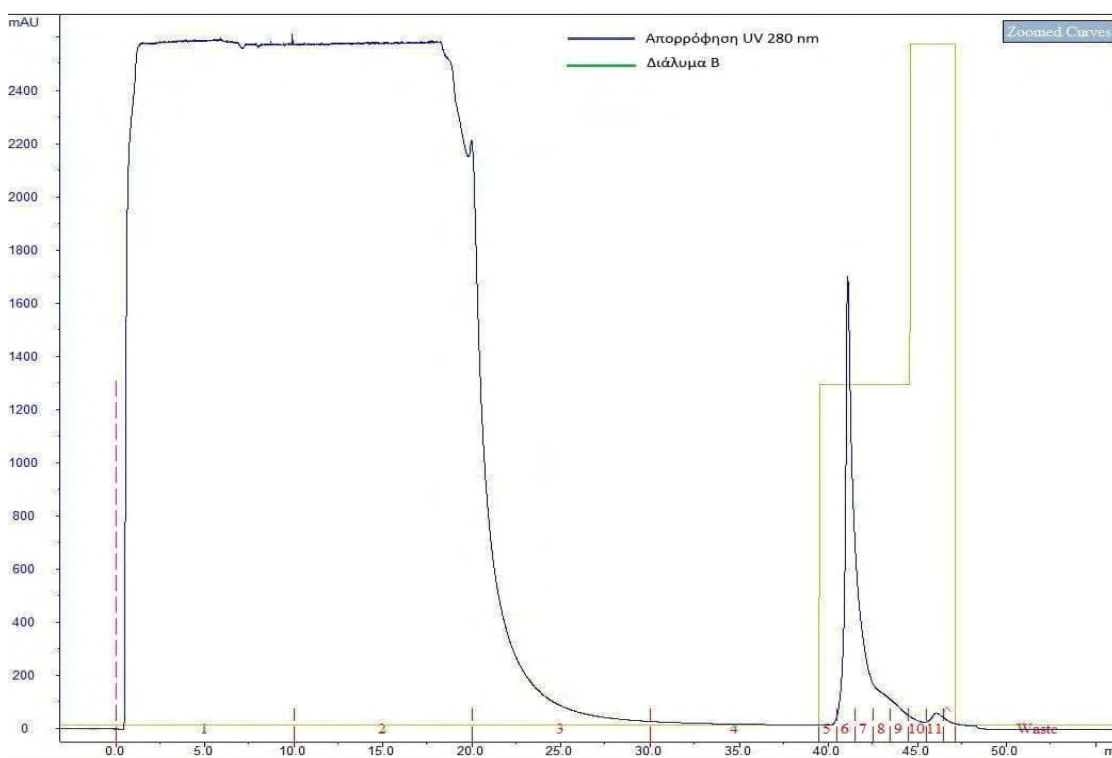
**Εικόνα 3.1:** 12% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κόνικλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: στο τέλος της διαδικασίας παραλαβής του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: πριν την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και συγκεκριμένα στην καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον πριν την ρύθμιση του pH, διαδρομή 3 (3<sup>η</sup> 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 rmGPb, 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:

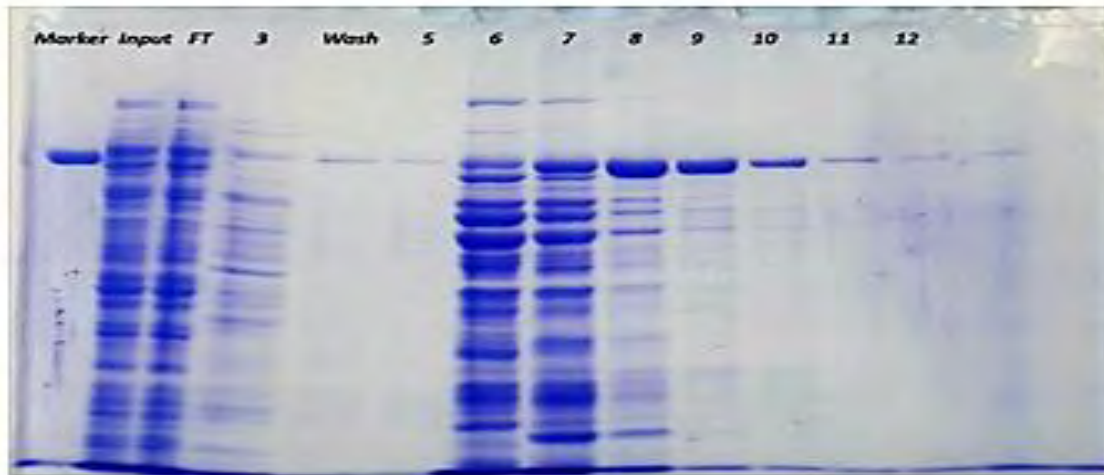
**1,04 g rmGPb ανά 2.3 kg σκελετικών μυών κόνικλων.**

### 3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της hIGPb

**Το πρώτο βήμα** για την απομόνωση και τον καθαρισμό της hIGPb βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εξαιτίας της ετικέτας των ιστιδινών που διαθέτει, εμφανίζει συγγένεια με τα Ni<sup>2+</sup> τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια σεφαρόζης στη στήλη. Η λύση των κυττάρων και η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το διάλυμα Α που περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου δεν αποτρέπετε η αποσύνδεση της πρωτεΐνης, άλλα αποτρέπετε, σε ένα βαθμό, η μη ειδική σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Το διάλυμα Β περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0. Η αυξημένη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο διάλυμα Β απομάκρυνε τις προσδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη.

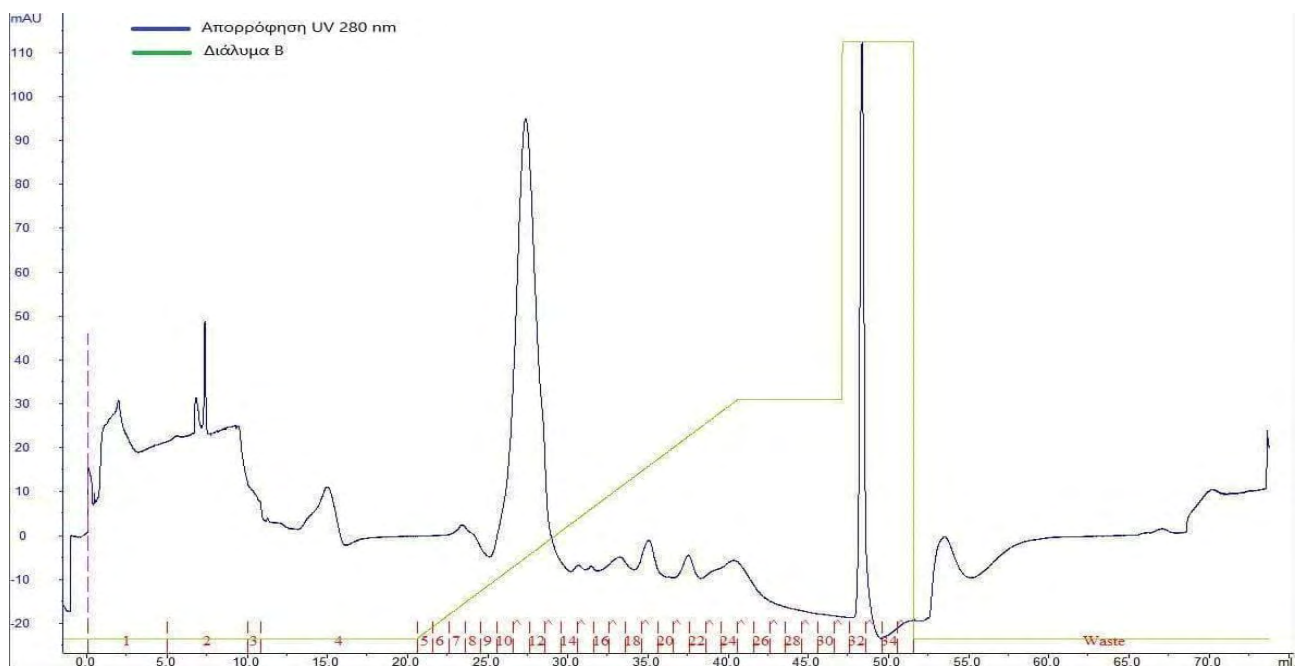


Εικόνα 3.2: Πρώτο βήμα καθαρισμού της hIGPb (His-Tag). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα

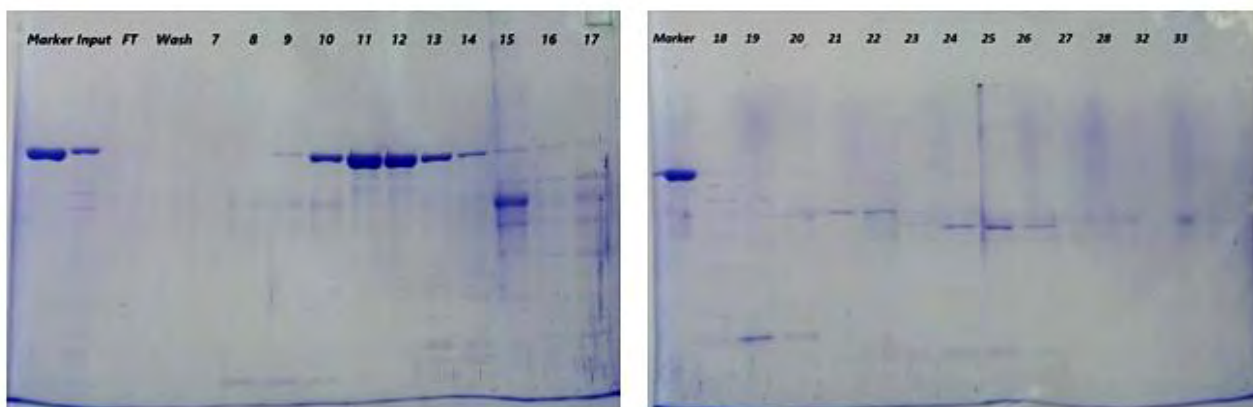


**Εικόνα 3.3:** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (*rmGPb*) και έχει μοριακό βάρος 97 KDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (*input*), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (*Flow Through*), διαδρομή 4: κλάσμα 3, διαδρομή 5 πλύση της στήλης (*Wash*), διαδρομές 6-13 έκλουση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 5-12).

**Το δεύτερο βήμα** απομόνωσης και καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η hIGPb προσδένεται στη στήλη Resource Q λόγω του αρνητικού φορτίου της σε pH 8.0. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα Tris-HCl 20 mM pH 8, DTT 1 mM (διάλυμα Α). Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα Β), διότι αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος.



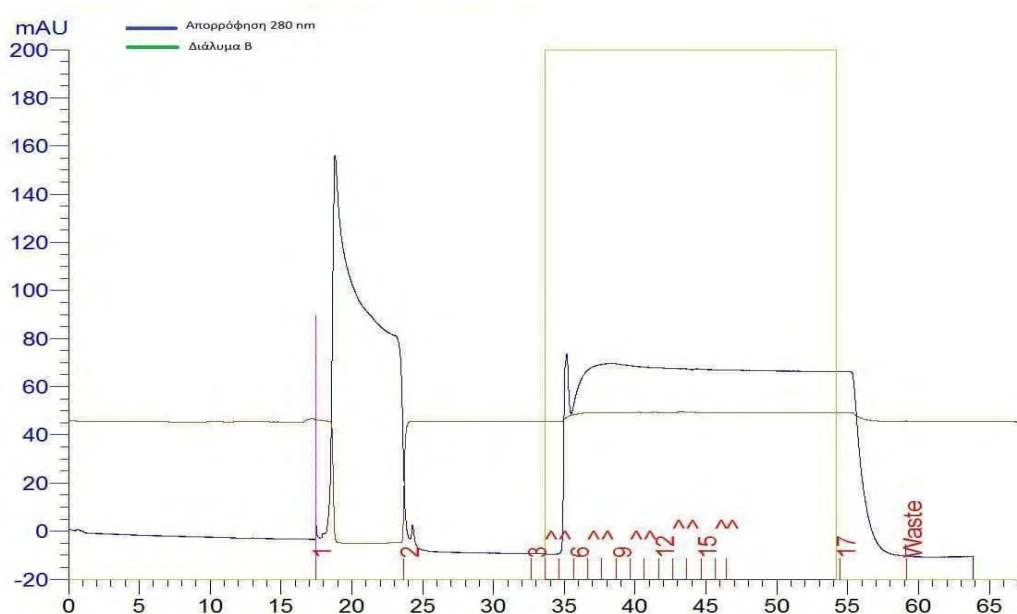
**Εικόνα 3.4 :** Δεύτερο βήμα καθαρισμού της hIGPb με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Resource Q). Η πρωτεΐνη εκλύεται με διαβάθμιση του διαλύματος B.



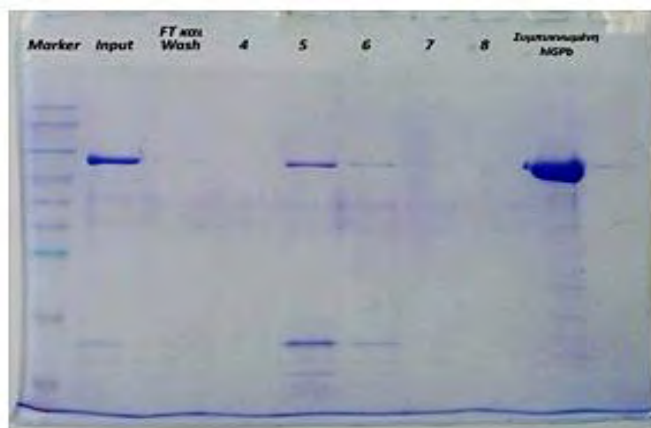
**Εικόνα 3.5 :** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (rmGPb) και έχει μοριακό βάρος 97 KDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 5-15 (1ο τζελ) και 2-14 (2ο τζελ) έκλυση των προσδεσμένων πρωτεϊνών στη στήλη αρχικά με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος B 0-40 % και στη συνέχεια με συγκέντρωση διαλύματος B 100% (κλάσματα 7-28 και 32-33).

**Το τρίτο βήμα** 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, 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 3.6 :** Τρίτο βήμα καθαρισμού της hIGP μετά την τμήση της ετικέτας συγγενείας από την πρωτεάση TEV (His-Trap): Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.



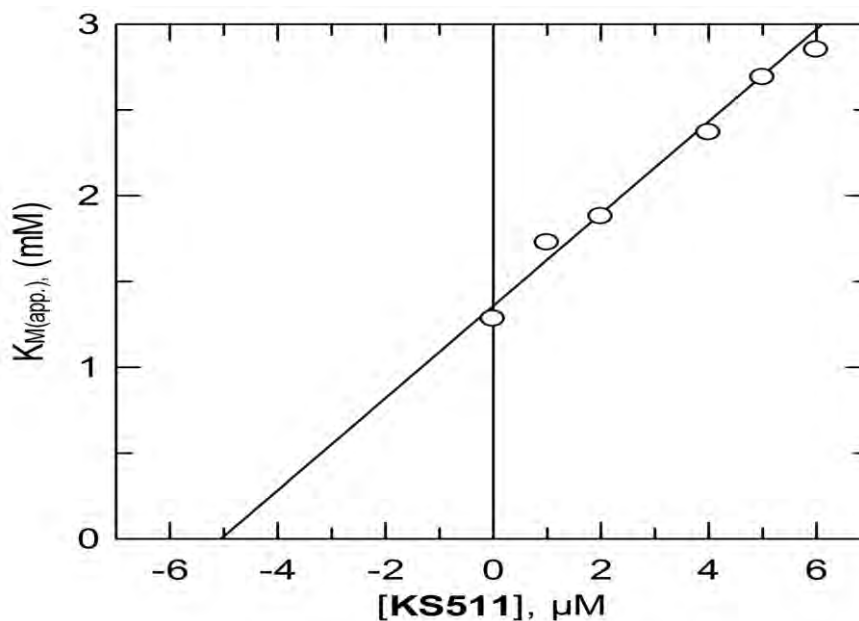
**Εικόνα 3.7 :** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη της (Flow Through, κλάσμα 2), διαδομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 4-8 έκλυση των προδεδεμένων πρωτεϊνών. Στη διαδρομή 9 παρουσιάζεται η hIGPb μετά τη συμπύκνωση της.

**Η τελική απόδοση καθαρισμού της hIGPb ήταν 70 μg ενζύμου ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας .**

## 3.2. Κινητικές μελέτες

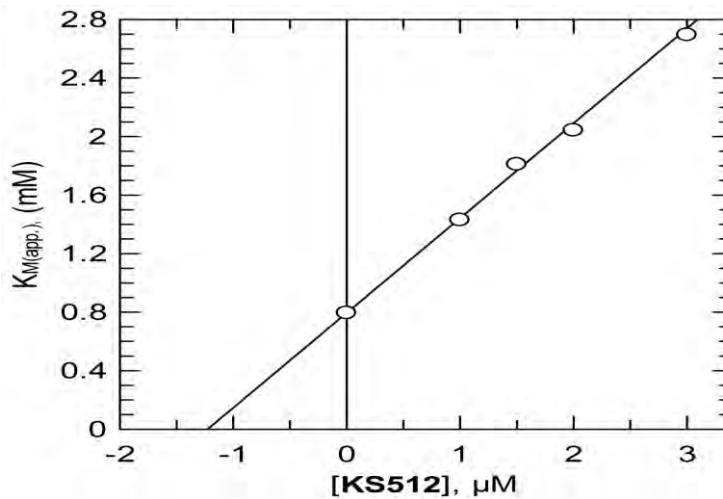
### 3.2.1. Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα *KS511* έναντι της *hIGPa*

Η  $K_i$  για τον αναστολέα **KS511** έναντι της *hIGPa* υπολογίστηκε σε  $5.05 \pm 0.40 \mu\text{M}$ .



Εικόνα 3.8 : Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της  $K_i$  για τον αναστολέα **KS511** ως προς την *hIGPa*.

### 3.2.2 Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα *KS512* έναντι της *hIGPa*



Η  $K_i$  για τον αναστολέα **KS512** έναντι της *hIGPa* υπολογίστηκε σε  $1.19 \pm 0.13 \mu\text{M}$ .

Εικόνα 3.9: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της  $K_i$  για τον αναστολέα **KS512** ως προς την *hIGPa*.

### 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 *rmGPb*. Ενώ στις εικόνες (3.10,3.12) παρουσιάζεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας για κάθε αναστολέα. Τέλος, στις εικόνες (3.11,3.13) παρουσιάζονται οι αναστολείς προσδεδεμένοι στο καταλυτικό κέντρο, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που δημιουργεί η προσθετική ομάδα του τριαζολικού δακτυλίου.

**Πίνακας 3.1** Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της *rmGPb* μεταξύ του αναστολέα **KS512** και των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Οι αριθμοί είναι αποστάσεις σε Å. Οι δεσμοί υδρογόνου αναφέρονται σε αποστάσεις < 3.3 Å

Άτομο αναστολέα	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (Å)	Αλληλεπιδράσεις <i>van der Waals</i>
C1'		Water311(O), Water329(O)
C2'		Glu672(OE2), His377(O), Water321(O), Water329(O)
O2'	Tyr573(OH):3.0, Glu672(OE2):3.2, Asn284(ND2):3.1, Water321(O):2.8, Water329(O):2.9	Asn284(CG,OD1),
C3'		Gly675(N), Glu672(OE2), Water133(O)
O3'	Ser674(N):3.1, Gly675(N):3.2, Glu672(OE2):2.6, Ala673(N):3.2	Ala673(CA,C,CB), Ser674(CA,C), Glu672(CG,CD,C), Water321(O)
C4'		Gly675(N), Water133(O)
O4'	Gly675(N):2.8, Water133(O):2.6	Gly675(C,O,CA), Thr676(N), Ser674(C,CB), Asn484(ND2)
C5'		Gly135(C), Leu136(N), Water133(O)
O5'		His377(ND1,CB), Leu136(CB,CA,N)
C6'		Gly135(C,O), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(CA,N)
O6'	Asn484(ND2):2.8, His377(ND1):2.7	Val455(CG2,CG1), Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Asn484(CG)
C1		Asn284(ND2), His377(CB,O), Water311(O)
N2	His377(O):2.7	Asn284(ND2,OD1), His377(CB,C),

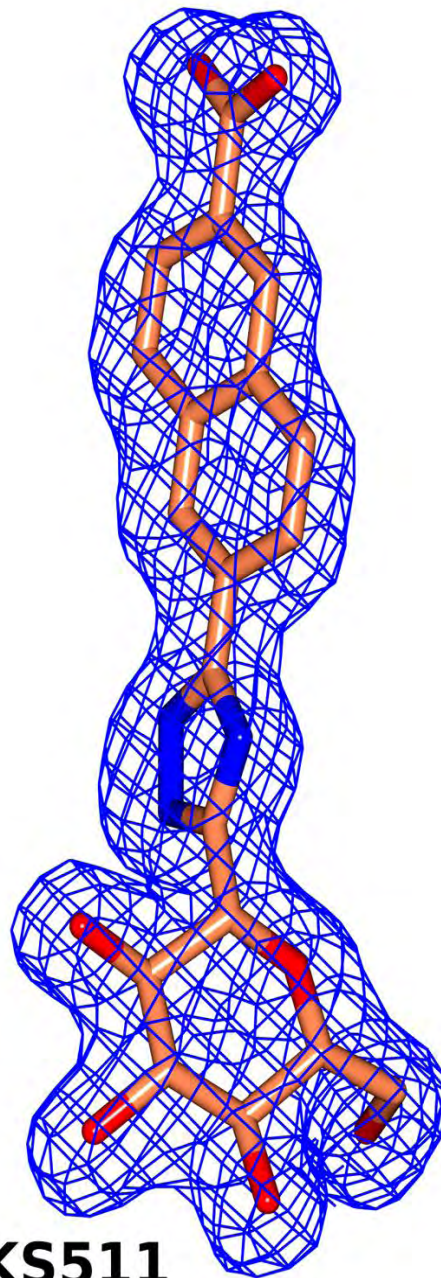


		Thr378(CB)
N3		Asn284(ND2,CG,OD1), His377(CB,O), Thr378(CB,CG2)
C4		Leu136(CD1), Asn284(ND2), Water311(O)
N5	Water311(O):2.9	Leu136(CB), Asn284(ND2)
C6		Asn284(N)
C7		Asn284(CA,N), Water343(O)
C8		His341(CE1,NE2), Asn284(N), Water343(O)
C9		Asn282(O), His341(CE1)
C10		Glu88(OE2), Asn282(O)
C11		Asn284(N), Water311(O)
C12		His341(NE2), Phe285(O), Water343(O)
C13		Phe285(O)
C14		Asn282(O), Water216(O)
C15		Arg292(NH2), Phe285(O), Water107(O)
C16		Arg292(NE,CZ,NH2), Water107(O)
C17		Tyr280(O,CB), Arg292(CZ,NH1,NH2)
C18		Glu88(OE2), Asn133(ND2), Asn282(O), Arg292(NH2), Water216(O)
<b>Σύνολο</b>	<b>15</b>	<b>107</b>

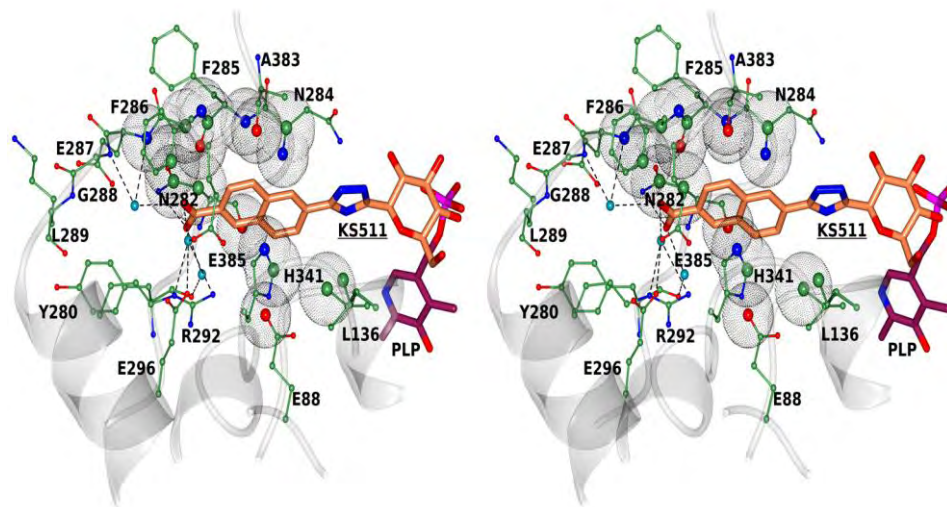
**Πίνακας 3.2** Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της *mGPb* μεταξύ του αναστολέα **KS511** και των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Οι αριθμοί είναι αποστάσεις σε Å. Οι δεσμοί υδρογόνου αναφέρονται σε αποστάσεις < 3.3 Å

Άτομο αναστολέα	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (Å)	Αλληλεπιδράσεις van der Waals
C1'		His377(O), Water332(O)
C2'		Glu672(OE2), His377(O), Water321(O), Water332(O)
O2'	Tyr573(OH):3.1, Glu672(OE2):3.2, Asn284(ND2):3.1, Water321(O):2.8, Water332(O):3.0	
C3'		Glu672(OE2), Gly675(N), Water133(O)
O3'	Ser674(N):3.1, Gly675(N):3.2, Glu672(OE2):2.6, Ala673(N):3.2	Ala673(C,CA,CB), Ser674(C), Glu672(CG,CD,C), Water321(O)
C4'		Gly675(N), Water133(O)
O4'	Gly675(N):2.9, Water133(O):2.6	Gly675(C,O,CA), Ser674(CB,C).Asn484(ND2)
C5'		Gly135(C), Leu136(N), Water133(O)
O5'		Leu136:A/B(CA,CB,N), His377(ND1,CB)
C6'		Gly135(O), Leu139(CD2), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(CA)
O6'	Asn484(ND2):2.8, His377(ND1):2.7	Val455(CG2,CG1), Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Asn484(CG)
C1		Asn284(ND2), His377(O), Water311(O)
N2	His377(O):2.7	His377(CB,C), Asn284(ND2,OD1), Thr378(CB)
N3		Asn284(ND2,CG,OD1), His377(CB,O), Thr378(CB,CG2), Asp339:B(OD2)
C4		Leu136(B:CD1,A:CD2), Asn284(ND2,CG)

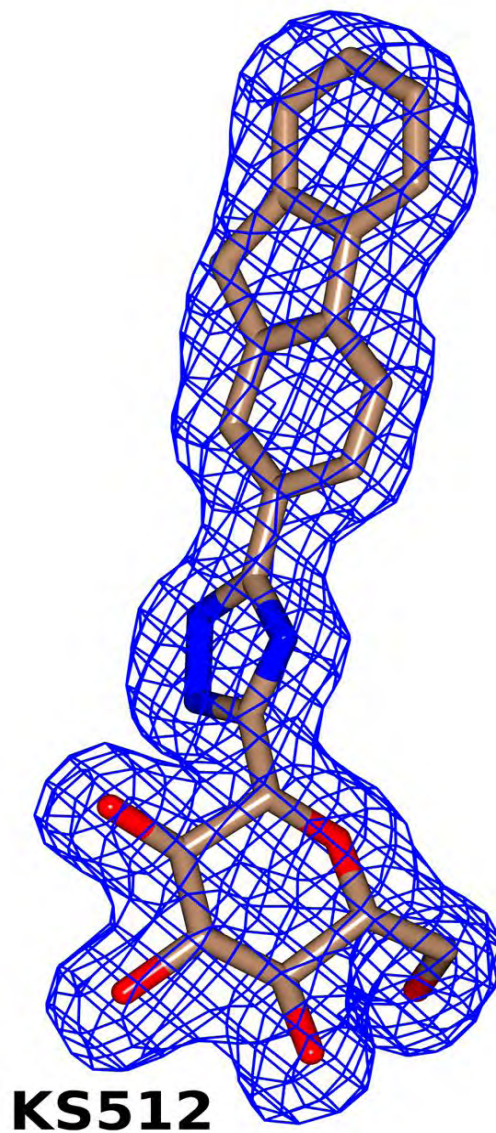
N5	Water311(O):3.0	Leu136:A/B(CB), Asn284(ND2)
C6		Leu136:A(CD2), Asn284(N)
C7		Asn284(CA,N), Water329(O)
C8		His341(CE1,NE2), Asn284(N), Water329(O)
C9		Asn282(O), Asn284(N), His341(CE1)
C10		Glu88(OE2), Asn282(O), Asn284(N)
C11		Leu136:A(CD2), Asn284(N), Water311(O)
C12		His341(NE2), Phe285(N), Ala383(O), Water329(O)
C13		His341(NE2), Phe285(C,O), Phe286(N,CA), Water107(O)
C14		Phe285(O), Water107(O)
C15		Asn282(O), Water388(O)
C16		Phe285(O), Water107(O), Water388(O), Water355(O)
O17	Water107(O):2.7, Water355(O):3.0	Phe285(O), Phe286(CA,CD1), Glu287(N)
O18	Asn282(ND2):3.3, Water388(O):2.8	Asn282(CB,CG), Phe285(O)
<b>Σύνολο</b>	<b>19</b>	<b>110</b>



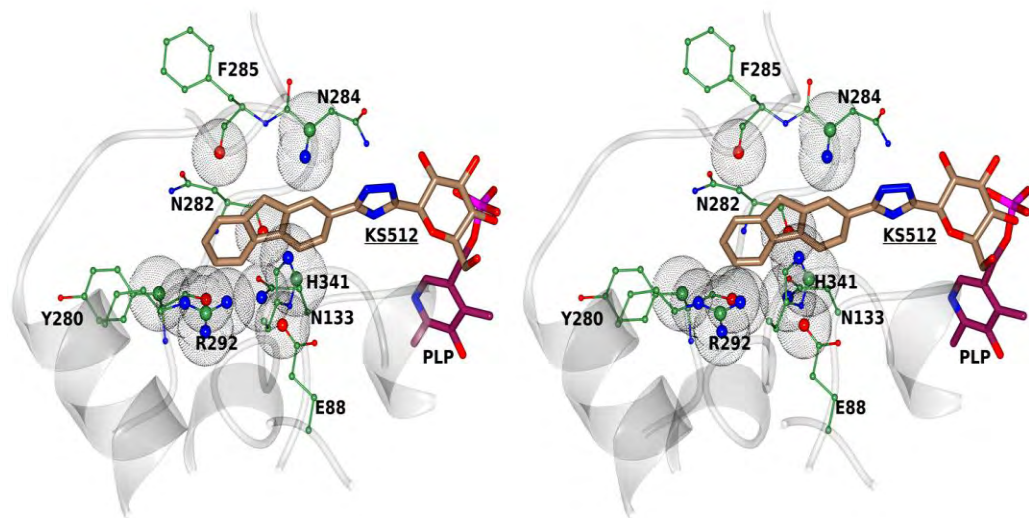
*Εικόνα 3.10 : Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  για τον αναστολέα KS511.*



**Εικόνα 3.11:** Πρόσδεση του **KS511** στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων VDW σε σφαίρες. Επίσης τα άτομα των καταλοίπων που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται μεγεθυμένα



**Εικόνα 3.12** : Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  για τον αναστολέα **KS512**.



**Εικόνα 3.13:** Πρόσδεση του KS512 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων VDW σε σφαίρες. Επίσης τα άτομα των καταλοίπων που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται μεγεθυμένα

## Συζήτηση

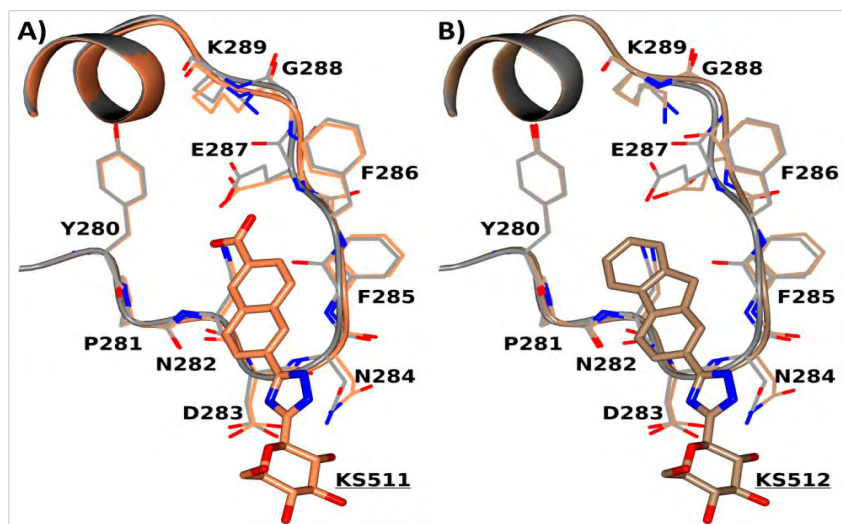
Η δέσμευση μεγάλου αριθμού προσδετών στα κέντρα πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει διερευνηθεί με πολλές βιοχημικές και δομικές μελέτες. Η πλειοψηφία τους αναφέρεται σε προσδέτες που δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο και είναι παράγωγα γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη, ο φυσιολογικός αναστολέας της *GP*, έχει σταθερά αναστολής ( $K_i$ ) 1.7 mM για την *GPb* και 4.9 mM για την *GPa*, αντίστοιχα. Η γλυκόζη σε ένα αυτορυθμιζόμενο σύστημα, αναστέλλει την αποικοδόμηση και επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη δράση της *GP* με αποτέλεσμα τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα να μειώνονται. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου έχει μελετηθεί με περισσότερα από 200 ανάλογα γλυκόζης. Η αποτελεσματικότητα των αναλόγων γλυκόζης αποδίδεται στο σχηματισμό ενός εκτεταμένου δικτύου πολικών και μη-πολικών αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα που σχηματίζουν τη β-εσοχή στο καταλυτικό κέντρο, όπου μόνο οι β-υποκαταστάτες της γλυκόζης μπορούν να συνδεθούν.[13]

Σε αυτή την εργασία έγιναν συγκριτικές μελέτες για την ανασταλτική επίδραση δύο αναλόγων γλυκόζης, του **KS511** και του **KS512**, στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*hIGPa*) με σύστημα *FPLC* και ακολούθησαν κινητικές μελέτες των αναστολέων **KS511**, **KS512** ως προς το ένζυμο. Οι τιμές των σταθερών αναστολής για τους **KS511** και **KS512** έναντι της *hIGPa* υπολογίστηκαν στα  $5.05 \pm 0.40$   $\mu$ M και  $1.19 \pm 0.13$   $\mu$ M αντίστοιχα. Από τις τιμές των  $K_i$  φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια ιδιαίτερα διαφορά στην ανασταλτική ισχύ αυτών των ενώσεων και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ισοδύναμοι. Η μικρή τους διαφορά ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός πως οι εντελώς μη πολικοί υποκαταστάτες όπως το φλουορένιο (**KS512**) αυξάνουν την ισχύ παραπάνω από τις περισσότερο πολικές όπως καρβοξυναφθαύλένιο (**KS511**).

Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση, καθαρισμός και κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*) και έγιναν δομικές μελέτες σε σύμπλοκο της *rmGPb* με τους **KS511** και **KS512**. Και οι δύο αναστολείς συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως φάνηκε από την ύπαρξη θετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνες 3.10,3.12). Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι οι αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης και του τριαζολικού δακτυλίου είναι παρόμοιες και στις δύο ενώσεις δημιουργώντας ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου το οποίο γεφυρώνεται και από



μόρια ύδατος. Οι προσθετικές ομάδες στο δακτύλιο του τριαζολίου σχηματίζουν περίπου τις ίδιες αλληλεπιδράσεις *van der Waals* σε αριθμό, και ο **KS511** δημιουργεί επιπλέον ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων στο οποίο συμμετέχουν και μόρια ύδατος ενώ δημιουργεί και ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *Asn282*. Επομένως, η μικρή διαφορά στις σταθερές αναστολής δεν μπορεί να αποδοθεί στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων. Όμως, η ποιότητα των αλληλεπιδράσεων που δημιουργεί η καρβοξυλική ομάδα του **KS511** έναντι του μη πολικού αναστολέα **KS512** θα μπορούσε να αιτιολογήσει αυτή τη μικρή διαφορά στις  $K_i$ . Η ύπαρξη της καρβοξυλικής ομάδας παρασύρει στην υδρόφοβη  $\beta$ -εσοχή μόρια ύδατος (Εικόνα 3.14), τα οποία τα φέρνει σε κοντινή απόσταση από το δακτύλιο του της *Phe286* ( $\sim 3.7$  Å) δημιουργώντας έτσι μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις οι οποίες όμως κατά ένα ποσοστό αντισταθμίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που δημιουργεί η καρβοξυλομάδα (O17, O18) με τα κατάλοιπα του βρόχου 280s (*Asn282*, *Phe285*, *Phe286*, *Glu287*). Αντίθετα, η πρόσδεση του **KS512** δεν παρασύρει μόρια ύδατος στην  $\beta$ -εσοχή καθώς δεν φέρει πολική ομάδα. Επιπλέον, η πρόσδεση του **KS511** επιφέρει μια μετατόπιση του καρβοξυλίου της κύριας ανθρακικής αλυσίδας της *E287* (Εικόνα 3.14) συγκριτικά με την ελεύθερη δομή απουσία προσδέτη κάτι το οποίο σημαίνει ότι για να προσδεθεί ο αναστολέας το ένζυμο πρέπει να καταβάλει ένα ενεργειακό κόστος, συνεπώς και μια αυξημένη σταθερά αναστολής.



**Εικόνα 3.14:** Υπέρθυση των συμπλόκων *rmGPb*-**KS511** (A) και *rmGPb*-**KS512** (B) με την ελεύθερη δομή (απουσία προσδέτη) που παρουσιάζεται με γκρι χρώμα

Η δέσμευση των αναστολέων στην καταλυτική θέση δεν προκάλεσε καμία σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης επί της συνολικής πρωτεϊνικής δομής. Στην υπέρθεση της ελεύθερης δομής (χωρίς προσδέτη) με τα σύμπλοκα των αναστολέων παρατηρούμε και στις δύο περιπτώσεις μια μικρή μετατόπιση του βρόχου 280s.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των δομικών και των κινητικών μελετών αναδεικνύουν ότι οι αναστολείς **KS511**, **KS512** μπορούν να αποτελέσουν υποσχόμενους αναστολείς για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς έχουν σημαντική αναστολή της τάξης 1-5  $\mu\text{M}$ . Επίσης, οι ενώσεις αυτές θα συμβάλουν στην κατανόηση των ιδιοτήτων της  $\beta$ -εσοχής και κατ' επέκταση τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων ώστε να συνδεθούν ακόμα πιο ισχυροί αναστολείς.

### Βιβλιογραφικές αναφορές

[1] 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 Feb;103(2):137-49.

[2] American Diabetes A. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9

[3] DYANNE P. WESTERBERG, DO *Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment.* , Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey

[4] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006

[5] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes.* Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis

[6] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.

[7] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. *Specific features of glycogen metabolism in the liver. Biochem J* 1998

[8] Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. *The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. Protein Sci*

[9] 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

[10] Loranne Agiu. *Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University.*

[11] 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

[12] Loranne Agiu. *Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University.*

[13] 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

[14] Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261

[15] Οικονομάκος Ν. Γ. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3

[16] Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis,

C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.;

[17] Oikonomakos, N. G. (2008), *New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents*, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983

[18] Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002), *High-throughput crystallography for lead discovery in drug design*, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1

[19] Γεωργιάτσος Ι.Γ. (2005). *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. Έκδοση 6η. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.

[20] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. *Principles of physical biochemistry*. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.

[21] Lineweaver H. B, D. *The Determination of Enzyme Dissociation Constants*, *J.Amer.Chem.*1934

[22] Yoshida N, Sato M. *Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009

[23] Ettre LS, Sakodynskii KI. Tswett, M.S. *And the Discovery of Chromatography .1. Early Work (1899-1903)*. *Chromatographia* 1993;35:223-31.

[24] John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer. *Πειραματική Βιοχημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

[25] Sheehan D. (2009) *Chromatography in Physical Biochemistry: Principles and Applications*. Wiley-Blackwell: Chichester, UK, second edition, 11–51.

[26] HealthCare G. *Affinity Chromatography - Principles and Methods*: GE HealthCare; 2007

[27] HealthCare G. *Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods*: GE HealthCare; 2010.

[28] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011

[29] Gel electrophoresis of proteins. Adapted from Chapter 7, *Gel Electrophoresis of Proteins*, by David E. Garfin, pages 197-268, in *Essential Cell Biology, Volume 1: Cell structure, A Practical Approach*, Edited by John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, Oxford UK (2003).

[30] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakos C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem* 2010

[31] 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

[32] Leatherbarrow RJ. *GraFit version 4.06*. Erithacus Software Ltd Staines 1998

[33] Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., (1985), Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.

[34] Rhodes G. *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006

[35] 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

[36]Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.

[37]COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.

[38]Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.

[39]Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.

[40] 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

[41] Marshall William, Bangert K. Stephen, Κλινική χημεία, 3η Ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2011