



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



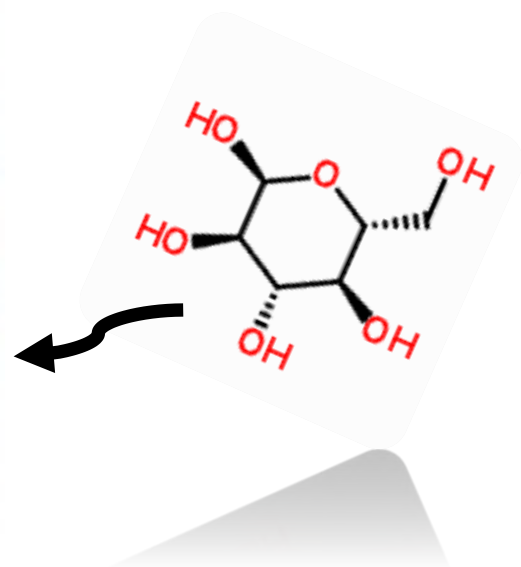
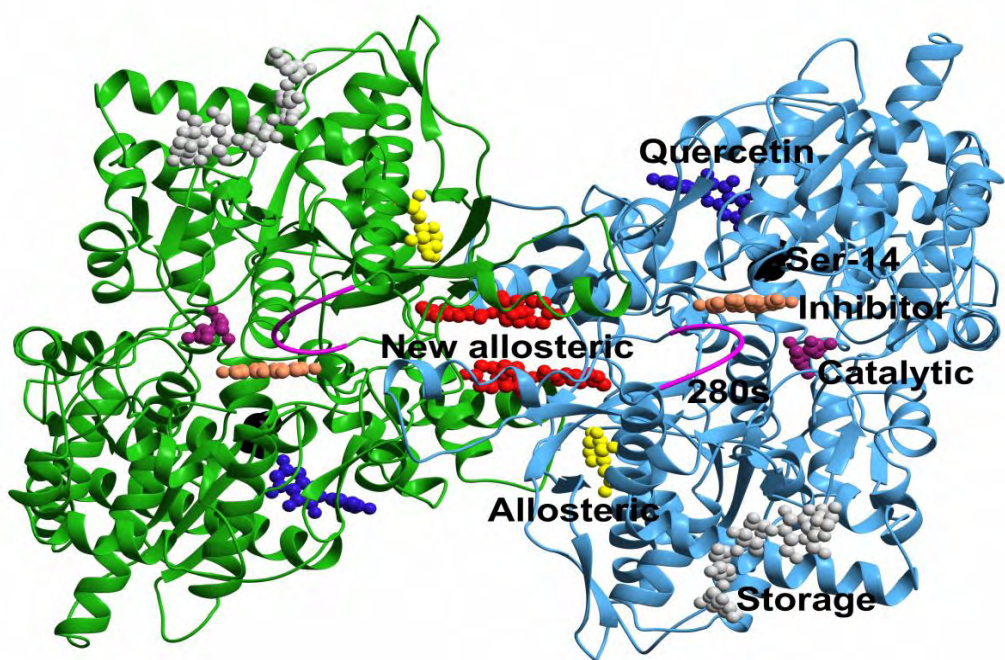
ΟΝΟΜΑ: ΓΚΕΡΔΗ ΑΛΚΗΣΤΙΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΑΝΤΙΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ



ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ
ΑΝΤΙΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.

SUBJECT OF BACHELOR'S THESIS:

INHIBITORS OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE AS ANTI-GLYCEMIC
INDICATORS.

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.

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
II.	ABSTARCT.....	8
III.	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	9
A.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
	I. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	11
	II. ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ-ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	13
	-ΑΝΟΧΗ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ.....	
	III. ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ: ΔΟΜΗ, ΡΟΛΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	16
	-ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	
	-ΦΩΣΦΟΡΙΚΗ ΠΥΡΙΔΟΞΑΛΗ (PLP).....	18
	-ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	19
		20
	IV. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ: ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	22
	-ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	
	-Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΩΣ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	22
	-Η GP ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΤΙΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	27
		29
	V. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	29
	- ΚΙΝΗΤΙΚΗ MICHAELIS - MENTEN.....	29
	-ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	29
	VI.ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ-ΣΥΣΤΗΜΑ FPLC.....	31
	-ΣΤΗΛΗ ΙΜΑC ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΙΟΝΤΑ Ni ²⁺	
	-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ IONEXCHANGECHROMATOGRAPHY.....	34
	(ΙΕΧ).....	36
	-ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΤΗΣ ΕΤΙΚΕΤΑΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	36
		39

VII. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ SDS-PAGE.....	40
VIII. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD.....	44
IX. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΑΚΤΙΝΕΣ Χ.....	44
-ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΙ.....	45
-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ.....	45
-ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ – ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ.....	47
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	
-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΕΤΑΙΡΕΙΑ.....	1
-ΟΡΓΑΝΑ.....	2
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ Β ΑΠΟ ΜΥΙΚΟ ΙΣΤΟ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ.....	3
-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ.....	
- ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΤΗΣ GPB.....	4
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ GP (HLGP).....	4
-ΣΤΗΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	9
3. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ HLGP.....	10
4. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ Ρ.....	11
5. ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.....	13
6. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	14
7. ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ.....	15
8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.....	15
9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	19
10. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ	20

ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	21
11. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΟΜΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ.....	23
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	
1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ RMGP.....	24
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΗLGP.....	26
3. ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	26
4. ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	27
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31
	33
	38

I. Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (ΣΔII) αποτελεί μια χρόνια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές στο μεταβολισμό και απαντάται πιο συχνά σε μεσήλικες έως ηλικιωμένους παχύσαρκους. Στα άτομα αυτά έχει παρατηρηθεί ανεπάρκεια των β-κυττάρων του παγκρέατος και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης [1].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*, EC: 2.4.1.1) αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, καθώς καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του αποδίδοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. [2] Η 1-φωσφορική γλυκόζη ισομερειώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*) στο ήπαρ και μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη για να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού, όταν η γλυκόζη που υπάρχει στην κυκλοφορία δεν επαρκεί (κατάσταση νηστείας). Στους διαβητικούς ασθενείς, η διάσπαση του γλυκογόνου συνεχίζει να αποτελεί σημαντική πηγή γλυκόζης παρά τα ήδη υψηλά επίπεδά της στο αίμα. Συνεπώς, η *GP* αποτελεί έναν έγκυρο μοριακό στόχο για τη θεραπεία του ΣΔ. Η *GP* είναι ένα ομοδιμερές αλλοστερικό ένζυμο και ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τροποποιητές (όπως το *AMP*, *ATP*, *G6P*), οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου. Η *GP* υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές, μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση *a* που απαντάται κυρίως στην ενεργό κατάσταση *R* και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση *b* που απαντάται κυρίως στη λιγότερο ενεργή κατάσταση *T*. Η φωσφορυλάση *b* μετατρέπεται στην *a* όταν φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 σε κάθε υπομονάδα της από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, και πιο συγκεκριμένα από την γ-καταλυτική της υπομονάδα. [3]

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η χημική ένωση *Szk158*, ένα μόριο ανάλογο C-β-D-γλυκόζης με ένα τριαζολικό δακτύλιο που συνέδεε τη γλυκοκυρανόζη με ένα δακτύλιο ναφθαλενίου, ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει την *GP*. Για τον σκοπό αυτό διεξήχθη αρχικά απομόνωση, καθαρισμός και ανάπτυξη κρυστάλλων της μυϊκής *GPb* από σκελετικό ιστό κονίκλων (*rabbit muscle GP*, *rmGPb*). Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής *GPb* (*hlGPb*) από μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη με μεθόδους ταχείας υγρής χρωματογραφία πρωτεϊνών (σύστημα *ÄKTA-FPLC*). Η *hlGPb* φωσφορυλιώθηκε για να μετατραπεί στη μορφή *a*, η οποία είναι ενεργή και ακολούθησαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) ως προς την *hlGPa*. Η K_i προσδιορίστηκε σε 11.5 μM και στη συνέχεια η εφαρμογή πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων – X αποκάλυψε την πρόσδεση του **Szk158** στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει ο αναστολέας με τα γειτονικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στην κατανόηση της ισχύς της αναστολής και παράλληλα προσέφεραν το γενικότερο πλαίσιο πάνω στο οποίο πρέπει να κατευθυνθεί η σύνθεση νέων χημικών ενώσεων με αυξημένη συγγένεια για τον ένζυμο μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων.

II. Abstract

Diabetes Mellitus type II constitutes one of the most common and serious chronic disorders in metabolism that is usually common between middle-aged as well as older obese people. These people have been diagnosed with inadequacy of b-cells of pancreas and resistance to insulin's effects. [1]

Glycogen Phosphorylase (GP) is an enzyme which plays a key role in catabolism of glycogen since it catalyzes the first step of the reactions of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (G1P). [2] G1P is initially converted to glucose-6-phosphate (G6P) in hepatic cells, and finally converted into free glucose so as to cover the energy needs of the whole organism, when glucose levels in blood circulation are not sufficient enough (fast state). In diabetes-diagnosed patients, glycogen breakdown continues being an important source of glucose, despite its existing high levels in blood. Consequently, GP constitutes a validated molecular target for diabetes treatment. Glycogen Phosphorylase is a homodimer and is regulated by different allosteric modifiers (such as AMP, ATP, G6P) which reflect the energy state of the cell. GP exists in two interchangeable forms, phosphorylase a (GP_a) with high activity and affinity for substrate (R-state) and phosphorylase b (GP_b) with low activity and affinity for substrate (T-state). The conversion of the b to a form is achieved by phosphorylation of Ser14 in each subunit of GP_b, by glycogen phosphorylase kinase (PhK). [3]

In this project, we assessed the inhibitory potency of a molecule that belongs to C- β -D-glucopyranosyl triazoles (**Szk158**), against rmGP. For this purpose, we firstly isolated and purified rabbit muscle glycogen phosphorylase (rmGP) and subsequently, we grew crystals of rmGP_b for X-ray crystallography analysis. Then, we isolated and purified human liver glycogen phosphorylase (hlGP) from recombinant bacteria cells using the automated ÄKTA-FPLC system. Human liver GP was converted to the a active form by phosphorylation. X-ray crystallography was employed to reveal the binding mode of **Szk158** to rmGP. Structural data revealed the binding of the inhibitor **Szk158** at the catalytic site of the enzyme GP and its interactions with residues at this site. These results highlight that C- β -D-glucopyranosyl triazoles are promising inhibitors for Glycogen Phosphorylase and are meticulously analyzed below.

III. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

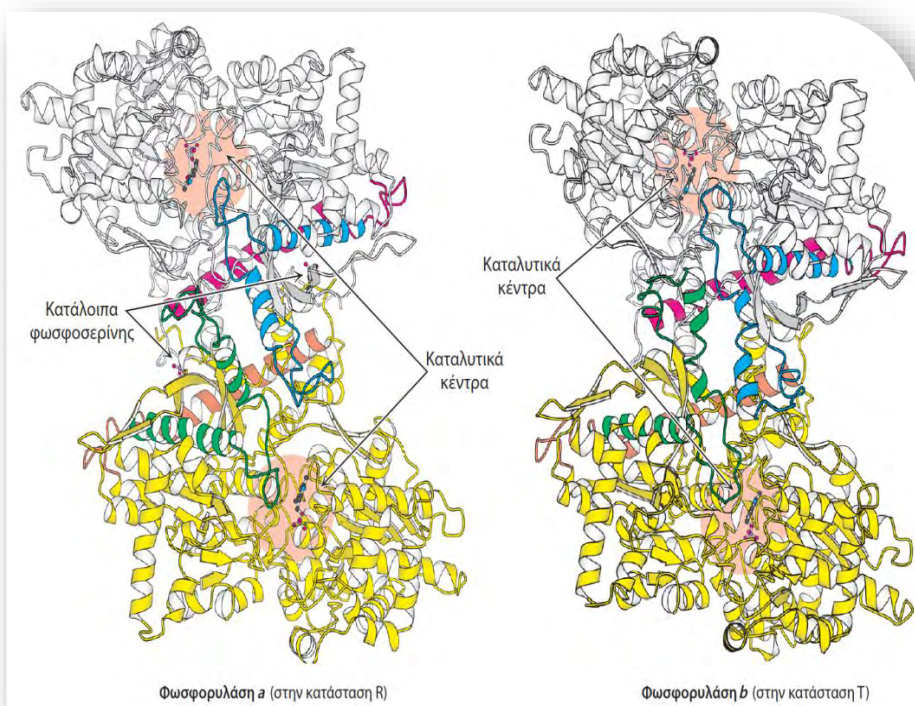
Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια των μηνών Νοέμβριος 2017 – Ιούλιος 2018. Οι προσπάθειες και η ενθάρρυνση πολλών ανθρώπων συναδέλφων και μη, έχουν κάνει δυνατή την παράδοση και παρουσίαση της παρούσας διπλωματικής. Σε καθέναν λοιπόν, απευθύνω τη βαθύτερη εκτίμησή. Μα πρωτίστως, είμαι βαθιά ευγνώμων και ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του TBB, Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα για την δυνατότητα που μου προσέφερε να επεκτείνω τις γνώσεις μου στον επιστημονικό κλάδο της Βιοχημείας, καθώς και για την άριστη επίβλεψη και οργάνωση τόσο της διπλωματικής μου εργασίας όσο και του εργαστηρίου ως συνόλου. Στην περάτωση της παρούσας εργασίας συνέβαλαν σημαντικά οι καθηγητές Δρ Σκαμνάκη Βασιλική, λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού και ο Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός, επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την προθυμία επίλυσης διαφόρων καθημερινών ζητημάτων που αφορούσαν την εργασία. Οι εν λόγω καθηγητές αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου απευθύνω επίσης, στην επίκουρο καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος, Δρ Άννα-Μαρία Ψαρρά και την επίκουρο καθηγήτρια πρωτεϊνικής χημείας Δρ Μαρία Κοντού, για την άρτια συνεργασία μας.

Μέσα σε ένα έντονο και απαιτητικό εργασιακό περιβάλλον στο οποίο συνυπάρχουν και εργάζονται πολλοί συνάδελφοι και καθηγητές, απαιτείται άρτια συνεργασία και αλληλοσεβασμός μεταξύ των μελών, αρετές τις οποίες καταφέραμε επιτυχώς να διατηρήσουμε εντός και εκτός του εργαστηρίου. Γι' αυτό και απευθύνω την πιο ειλικρινή μου εκτίμηση και ευχαριστίες στα μέλη ολόκληρου του εργαστηρίου, από τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές μέχρι τους υποψήφιους διδακτορικούς συναδέλφους Κυριάκη Ευθύμιο και Στραβοδήμο Γεώργιο, οι οποίοι ήταν πάντοτε διαθέσιμοι, υπομονετικοί και πρόθυμοι να βοηθήσουν στα καθημερινά ζητήματα και απορίες σχετικά με τη διπλωματική μου εργασία. Επιπλέον, τους ευχαριστώ ιδιαίτερα, καθώς εκτός από τις απορίες και τα ζητήματα στα πλαίσια της εργασίας, έθεταν ερωτήματα ευρύτερου βιοεπιστημονικού περιεχομένου επιτρέποντάς μου να προβληματιστώ μαζί τους περαιτέρω σε διάφορα ζητήματα ερευνητικού ενδιαφέροντος. Δε θα μπορούσα, βέβαια, να μην ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς μου συναδέλφους, με τους οποίους ξεκινήσαμε μαζί σαν ομάδα την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας και την ολοκληρώσαμε επιτυχώς με άρτια συνεργασία και πνεύμα ομαδικότητας.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον *Dr Somsák László* για την προσφορά της χημικής ένωσης και τον Δρ. Ζωγράφο Σπύρο για τη συνεισφορά του στη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, καθώς και ορισμένους πολύ στενούς μου φίλους, οι οποίοι συμμερίστηκαν την όλη προσπάθεια για τη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας και με υποστήριξαν με υπομονή.

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΚΟΝΑ1: Οι δύοισομορφές α και β τους διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μαζί με το καταλυτικό τους κέντρο.



I. Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (*Diabetes Mellitus*) αποτελεί την πιο κοινή μεταβολική ασθένεια στον κόσμο που έχει προσβάλλει και συνεχίζει να προσβάλλει καθημερινά εκατομμύρια ανθρώπους. Πρόκειται για μια χρόνια μεταβολική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, ο οποίος προκύπτει από ελλιπή έκκριση ινσουλίνης ή από ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. [7] Όσον αφορά την αιτιολογία της ασθένειας, υπάρχει μεγάλη διακύμανση ως προς τις αιτίες εκδήλωσης του σακχαρώδους διαβήτη επειδή επηρεάζεται από την αναλογία πολλών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ηλικία, η παχυσαρκία, η διατροφή, η άσκηση, η γενετική προδιάθεση, ακόμα και οι διαταραχές στο κεντρικό νευρικό σύστημα που μπορούν να δημιουργήσουν δυσλειτουργία και απώλεια των β-κυττάρων του παγκρέατος από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη. Σχετικά με την συμπτωματολογία της ασθένειας, τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη είναι συνήθως η υπεργλυκαιμία, η πολυουρία, η πολυδιψία, η απώλεια βάρους και ορισμένες φορές η πολυφαγία και η θολή όραση. Οι οξείες, απειλητικές για τη ζωή συνέπειες του διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία μεμεταβολική κετοξέωση. Οι ασθενείς με διαβήτη έχουν επίσης αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής, περιφερικής αρτηριακής και εγκεφαλοαγγειακής νόσου, καθώς η υπέρταση και οι ανωμαλίες του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών είναι συνήθη στους ασθενείς αυτούς. [8]

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι σακχαρώδους διαβήτη:

- **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I** ή ινσουλινοεξαρτώμενος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Ο ρυθμός με τον οποίο τα β-παγκρεατικά κύτταρα καταστρέφονται, διαφέρει ανάμεσα στους ασθενείς και μπορεί κυμαίνεται από ραγδαίος (κυρίως στα παιδιά) έως βραδύς (κυρίως σε ενήλικες). Μάλιστα, στους περισσότερους ασθενείς ανιχνεύονται αυτο-αντισώματα έναντι των β-κυττάρων του παγκρέατος (αυτοάνοση διαταραχή) και καταλήγουν τελικά, στη χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης προκειμένου να επιζήσουν, αν και πάλι ελλοχεύει ο κίνδυνος εμφάνισης κετοξέωσης. [9] Η ενίσχυση του καταβολισμού των λιπών αυξάνει την απελευθέρωση των κετοοξέων στο πλάσμα ταχύτερα από το ρυθμό πρόσληψης και οξείδωσης τους από τα ιστικά κύτταρα. Στη διαβητική κετοξέωση η χαμηλή συγκέντρωση ινσουλίνης σε συνδυασμό με την αύξηση των επίπεδων των κατεχολαμινών, της κορτιζόλης και της αυξητικής ορμόνης οδηγούν στην ενεργοποίηση της ορμονοευαίσθητης λιπάσης που προκαλεί διάσπαση των τριακυλογλυκερολών και απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στο ήπαρ σε κετονοσώματα, τα οποία απελευθερώνονται στην κυκλοφορία. Η εμφάνιση της διαβητικής κετοξέωσης γίνεται όταν υπάρχει

υπερπαραγωγή της γλυκόζης και των κετονών στο ήπαρ ως αποτέλεσμα της μεταβολής στην ισορροπία της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης. Ο συνδυασμός της αυξημένης παραγωγής ηπατικής γλυκόζης και η μειωμένη περιφερειακή χρήση της, είναι η κύρια παθολογική διαταραχή που ευθύνεται για τη διαβητική κετοξέωση. [106]

- **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II** ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος, ο οποίος οφείλεται στην ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης και αντιπροσωπεύει το 90-95% των ατόμων με διαβήτη. Η νόσος αυτή αποκαλείται και σακχαρώδης διαβήτης της ενηλικίωσης, διότι στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται στην ηλικία των 30 και αρκετά συχνά στην ηλικία των 50 ή 60, έχοντας σταδιακή εξέλιξη. Η μειωμένη ευαισθησία προς την ινσουλίνη που εμφανίζουν τα άτομα-ασθενείς, αναφέρεται συχνά και ως ανοχή στην ινσουλίνη. Ο ΣΔ II, σε αντίθεση με τον ΣΔ I, σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα (υπερινσουλιναιμία), κάτι το οποίο οφείλεται στην αντίρροπη απάντηση των β-παγκρεατικών κυττάρων, ώστε να μειωθεί η ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Έτσι λοιπόν, ο ΣΔ II εμφανίζεται όταν το πάγκρεας αποτυγχάνει να εκκρίνει την απαραίτητη ποσότητα ινσουλίνης που απαιτεί ο μεταβολισμός, λόγω επίκτητης εκκριτικής δυσλειτουργίας των β-παγκρεατικών κυττάρων ή λόγω μείωσης της μάζας τους. Σε αντίθεση με τον τύπου I, εκκρίνονται ποσά ινσουλίνης, τα οποία όμως δεν επαρκούν για να καλύψουν τις μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού. Η αδυναμία των β-παγκρεατικών κυττάρων να παράγουν την απαραίτητη ινσουλίνη ενδέχεται να οφείλεται σε σημαντική αύξηση της απόπτωσης των β-κυττάρων, μια διαδικασία που πιθανότατα επάγεται από τη χρόνια υπεργλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία και/ή από ορισμένες κυτοκίνες που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση των β-παγκρεατικών κυττάρων. Το αποτέλεσμα είναι μια μείωση στη λειτουργική μάζα των β-κυττάρων του παγκρέατος στον ΣΔ II. [107]

Όσον αφορά τη θεραπεία της ασθένειας, επί χρόνια χρησιμοποιούνταν και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως η μετφορμίνη, η οποία αποτελεί αντιυπεργλυκαιμικό φάρμακο δρώντας με διάφορους τρόπους:

- Μειώνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και αυξάνει την πρόσληψή της.
- Αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, χωρίς να επηρεάζει την έκκρισή της.

Διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, όπως η φωσφοφυλάση του γλυκογόνου, αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για την ανάπτυξη εν δυνάμει αντιυπεργλυκαιμικών μορίων, τα οποία μπορούν να δράσουν ως αντιδιαβητικά φάρμακα.

I. Ομοιόσταση της γλυκόζης – Ορμόνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου

Το ήπαρ συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, καθώς είναι το όργανο το οποίο ρυθμίζει τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, ώστε να διατηρούνται φυσιολογικά τα επίπεδα γλυκόζης σε ολόκληρο τον οργανισμό. Για παράδειγμα, μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, ένα ποσοστό της γλυκόζης οξειδώνεται ενώ ένα άλλο αποθηκεύεται ως γλυκογόνο για χρήση ως πηγή ενέργειας σε συνθήκες νηστείας. Σε κατάσταση νηστείας, η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα διατηρείται χάρη στη διάσπαση του γλυκογόνου στο ήπαρ το οποίο προμηθεύει με γλυκόζη ολόκληρο τον οργανισμό. Στη συνέχεια, με τη γλυκονεογένεση που λαμβάνει χώρα, κυρίως στο ήπαρ αλλά και στους νεφρούς, αναπληρώνεται η γλυκόζη που έχει προηγουμένως χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας και μπορεί να αποθηκευτεί εκ νέου με τη μορφή του πολυμερούς γλυκογόνου.

Υπάρχουν αρκετές ορμόνες οι οποίες εμπλέκονται στην ομοιοστασία της γλυκόζης και είναι η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη, η επινεφρίνη, η κορτιζόλη και η αυξητική ορμόνη. Σε γενικές γραμμές, η ινσουλίνη αποτελεί τη μόνη ορμόνη η οποία μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ενώ οι άλλες ορμόνες τείνουν να ανταγωνίζονται τις δράσεις της ινσουλίνης. [4]

ο *Γλυκαγόνη*

Η γλυκαγόνη είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση του σακχάρου είναι χαμηλή. Επιταχύνει τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση, ενώ επιβραδύνει τη γλυκογονοσύνθεση και τη γλυκόλυση. Όλες αυτές οι επιδράσεις της γλυκαγόνης αυξάνουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης στα ηπατοκύτταρα και στη συνέχεια στο αίμα, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που επιφέρει η δράση της ινσουλίνης. Η γλυκαγόνη προσδέεται στον υποδοχέα της ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων *GPCR* με τις 7 διαμεμβρανικές α-έλικες. Το σηματοδοτικό μονοπάτι οδηγεί σε ενεργοποίηση της *PKA* η οποία έπειτα φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου ενώ παράλληλα φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου οδηγώντας έτσι σε διάσπαση του γλυκογόνου.

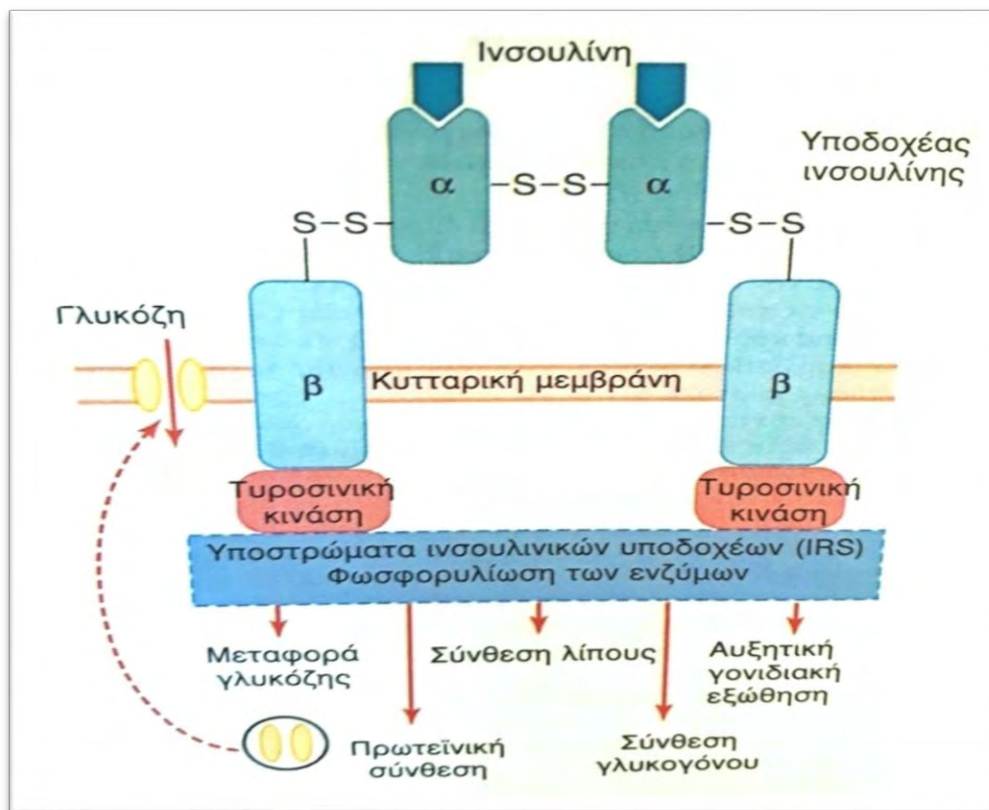
ο *Επινεφρίνη*

Η έκκριση της επινεφρίνης αυξάνεται όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα μειώνεται. Στους μύες, επιταχύνει τη γλυκογονόλυση, αυξάνοντας έτσι την ανασύνθεση *ATP* από τους υδατάνθρακες. Ενώ στο ήπαρ, επιταχύνει τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογέννεση, αυξάνοντας έτσι την παροχή γλυκόζης στο αίμα και μετέπειτα στους μύες. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη απελευθέρωση επινεφρίνης και κυρίως νορεπινεφρίνης από τις απολήξεις των συμπαθητικών νεύρων διεγείρει την έκκριση γλυκαγόνης και αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Αυτό αυξάνει την παροχή γλυκόζης στο αίμα δεδομένου της υπεργλυκαιμικής δράσης της γλυκαγόνης και της υπογλυκαιμικής δράσης της ινσουλίνης. [6] Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί η επινεφρίνη είναι το ίδιο με αυτό που ενεργοποιεί η γλυκαγόνη συνδεόμενη με τον υποδοχέα της στα ηπατοκύτταρα.

ο *Ινσουλίνη*

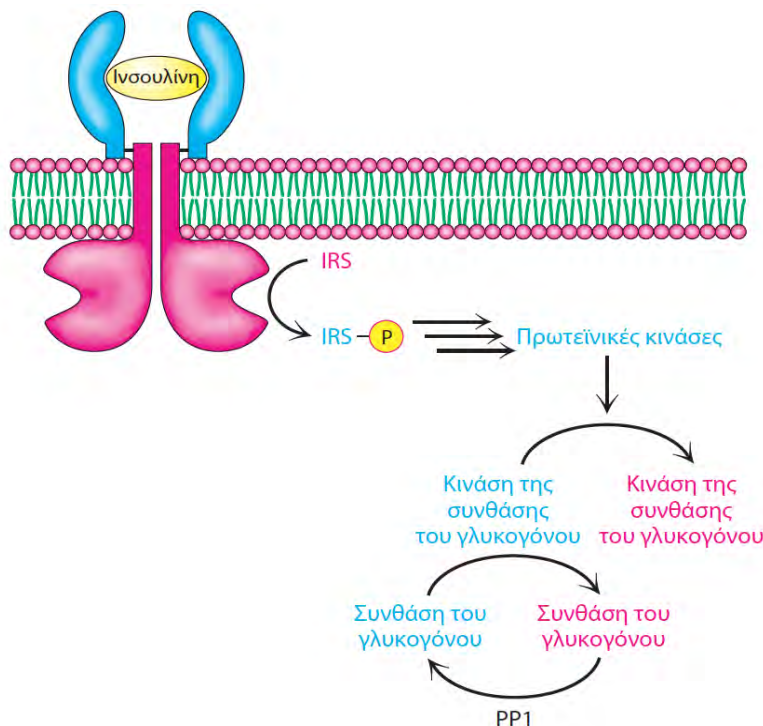
Η ανθρώπινη ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 5.808 Da και αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Συντίθεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος ή νησίδες *Langerhans* για τον σχηματισμό αρχικά μιας προορμόνης της ινσουλίνης. Η αρχική αυτή προορμόνη έχει μοριακό βάρος 11.500 Da περίπου, αλλά στη συνέχεια διασπάται στο Ε.Δ. για να σχηματίσει μια προϊνσουλίνη με Μ.Β. 9.000 Da περίπου, που αποτελείται από 3 πεπτιδικές αλυσίδες. Το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης κόβεται περαιτέρω σε μικρότερα κομμάτια στη συσκευή Golgi και έτσι παράγεται η ινσουλίνη, η οποία αποτελείται την α αλυσίδα (21 αμινοξέα) και τη β αλυσίδα (30 αμινοξέα), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ινσουλίνη διευκολύνει την είσοδο της γλυκόζης στο μυ και στο λιπώδη ιστό, ενισχύοντας τη μετακίνηση των υποδοχέων της γλυκόζης *GLUT4* από τα ενδοκυτταρικά κυστίδια προς την κυτταρική μεμβράνη, ώστε να μπορεί να μεταφερθεί με παθητική μεταφορά η γλυκόζη από το εξωκυττάριο υγρό στο εσωτερικό του κυττάρου. Η είσοδος αυτή της γλυκόζης στα κύτταρα δεν είναι μια διαδικασία απλής διάχυσης, αλλά απαιτείται η συμμετοχή μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα ώστε να διευκολυνθεί η κίνηση της γλυκόζης κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης ενός κυττάρου. Οι μεταφορείς *GLUT4* βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα ερυθροκύτταρα, στους μύες και το λιπώδη ιστό, οι μεταφορείς *GLUT1* βρίσκονται επίσης στα ερυθροκύτταρα ενώ οι μεταφορείς *GLUT2* επάγουν κυρίως τη μεταφορά της γλυκόζης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Μία ακόμη δράση της ινσουλίνης είναι η επιτάχυνση της γλυκογονοσύνθεσης, αλλά συγχρόνως και η επιβράδυνση της γλυκογονόλυσης σε ήπαρ και μυ. Επιπλέον, επιταχύνει τη γλυκόλυση και επιβραδύνει τη γλυκονεογέννεση στο ήπαρ, ώστε να μην υπάρχει περαιτέρω ελεύθερη διαθέσιμη γλυκόζη στον οργανισμό. Πιο αναλυτικά, η ινσουλίνη προκειμένου να επιταχύνει τη γλυκογονοσύνθεση, μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της, ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δράσης

κινάσης τυροσίνης. Συγκεκριμένα, ο *υποδοχέας της ινσουλίνης* ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων κινάσες τυροσίνης και αποτελείται από δύο α-υπομονάδες και δύο β-υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς δημιουργώντας ένα τετραμερές $\alpha_2\beta_2$. Οι α-υπομονάδες βρίσκονται εξ ολοκλήρου στην εξωκυτταρική περιοχή και περιέχουν και μια περιοχή πολύ πλούσια σε κυστεΐνη. Στις α-υπομονάδες βρίσκεται η θέση σύνδεσης της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη με μορφή διμερούς μορίου ενώνεται ταυτόχρονα με τις δυο θέσεις σύνδεσής της, προκαλώντας έτσι μια αλλαγή στη διαμόρφωση των α-υπομονάδων, η οποία μεταδίδεται στις β-υπομονάδες, οι οποίες έτσι ενεργοποιούνται. Οι β-υπομονάδες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με το αμινοτελικό άκρο στην εξωκυτταρική περιοχή, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο στο κυτταρόπλασμα. Στο εσωτερικό κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν τη δράση της κινάσης τυροσίνης (εικόνα 2).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Η ινσουλίνη θα συνδεθεί αρχικά με τις α-υπομονάδες του υποδοχέα, έπειτα θα προκληθεί αυτοφωσφορυλίωση των β-υπομονάδων, η οποία με τη σειρά της θα προκαλέσει την ενεργοποίηση της δράσης της κινάσης τυροσίνης. Η δράση κινάσης τυροσίνης, στη συνέχεια, προκαλεί φωσφορυλίωση άλλων ενδοκυττάρων ενζύμων, όπως για παράδειγμα υποστρώματα ινσουλινικών υποδοχέων IRS. Έτσι, ορισμένα ένζυμα ενεργοποιούνται, ενώ άλλα απενεργοποιούνται. [10]

Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, η δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της μέσω του παραπάνω σηματοδοτικού μονοπατιού, οδηγεί σε ενεργοποίηση μιας πρωτεϊνικής κινάσης ευαίσθητης στην ινσουλίνη. Αυτή η ενεργοποίηση γίνεται με φωσφορυλίωση της υπομονάδας R_{GI} της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (*PP1*), σε μία θέση διαφορετική από εκείνη που τροποποιείται με την *PKA*. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί στη σύνδεση της υπομονάδας R_{GI} με την *PP1* και το μόριο του γλυκογόνου. Με την επακόλουθη αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, της κινάσης της φωσφορυλάσης (*Phk*) και της *GP*, προάγεται η σύνθεση του γλυκογόνου ενώ εμποδίζεται η αποικοδόμησή του. Δηλαδή, η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ελέγχονται συντονισμένα (εικόνα 3). [39]



ΕΙΚΟΝΑ 3:

Η ινσουλίνη ενεργοποιεί την *PP1*, η οποία: α) αποφωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου και έτσι την ενεργοποιεί και β) αποφωσφορυλιώνει την κινάση της φωσφορυλάσης και την καθιστά ανενεργή.

➤ *Ανοχή στην ινσουλίνη*

Όταν η ινσουλίνη εκκρίνεται και περνά στην κυκλοφορία του αίματος, βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά σε ελεύθερη μορφή, με χρόνο ημιζωής στο πλάσμα περίπου 6 λεπτά. Κατά συνέπεια, αποσύρεται από την κυκλοφορία σε χρονικό

διάστημα 10-15 λεπτών. Για την έναρξη των επιδράσεων της ινσουλίνης στα κύτταρα-στόχους πρέπει πρώτα να γίνει σύνδεση με τον υποδοχέα της. [9] Η δομή και ο τρόπος ενεργοποίησης του υποδοχέα της αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

Η ινσουλίνη κατευθύνει τον ενδοκυττάριο μεταβολικό μηχανισμό για να προκαλεί τις επιθυμητές επιδράσεις στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Συνεπώς, ως «ανοχή στην ινσουλίνη» ορίζουμε τη μειωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης, πιθανώς επειδή, παρά την σύνδεσή της στον υποδοχέα της, δε μπορεί να μεταδοθεί περαιτέρω το σήμα διαμέσου των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται στη συνέχεια. Η αντίσταση στην ινσουλίνη εμφανίζεται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

III. Γλυκογόνο: δομή, ρόλος, σύνθεση και αποικοδόμηση

Το γλυκογόνο, όπως και το άμυλο, αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους πολυσακχαρίτες του οργανισμού που μπορεί να αποθηκεύει τεράστια ποσά ενέργειας. Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές που αποτελείται από πολλά μόρια/κατάλοιπα γλυκόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1,4. Ενώ, οι διακλαδώσεις που εμφανίζονται περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο γλυκόζης σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1,6. Το γλυκογόνο αποθηκεύεται στο ήπαρ, όπου και βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση, και στους σκελετικούς μύες σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Στο ήπαρ, η ρύθμιση της σύνθεσης και του καταβολισμού του γλυκογόνου γίνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούνται φυσιολογικά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, για την κάλυψη των αναγκών ολόκληρου του οργανισμού. Ενώ στους μύες, η ρύθμιση των παραπάνω διεργασιών αποσκοπεί στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών για τους ίδιους τους μύες.

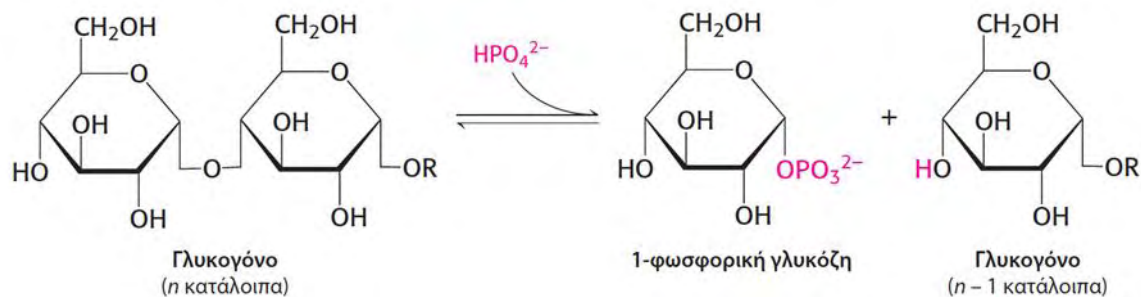
Χάρη στον ελεγχόμενο μεταβολισμό του γλυκογόνου, δηλαδή την ελεγχόμενη απελευθέρωση καταλοίπων γλυκόζης από το μόριό του, αυξάνεται η ποσότητα της διαθέσιμης γλυκόζης στον οργανισμό μεταξύ των γευμάτων και ρυθμίζονται τα επίπεδά της στο αίμα. Η ταχεία κινητοποίηση της γλυκόζης από το μόριο του γλυκογόνου είναι πολύ σημαντική πηγή ενέργειας για τον οργανισμό ιδιαίτερα σε καταστάσεις ξαφνικής έντονης δραστηριότητας, όπως παραδείγματος χάριν σε έντονες και γρήγορες αθλητικές δραστηριότητες. [11]

Η άμεση οδός σύνθεσης του γλυκογόνου απαιτεί τη μεταφορά γλυκόζης σε κύτταρα, από ένα ή περισσότερους *GLUTs* (μεταφορείς γλυκόζης). Το 1957, ο *Luis Lenoir* έδειξε ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (*UDP-γλυκόζη*). Η *UDP-γλυκόζη* συντίθεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη (*UTP*) σε μία αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της *UDP-γλυκόζης*. Υπάρχει ένα εξειδικευμένο βήμα έναρξης στο οποίο η γλυκογονίνη αυτο-γλυκοζυλιώνεται για να σχηματίσει μια αλυσίδα εναρκτήρα 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, χρησιμοποιώντας επίσης *UDP-γλυκόζη* ως δότη γλυκοζυλίου. Τα α -1,6-γλυκοσιδικά σημεία σχηματίζονται από τη δράση του ενζύμου διακλάδωσης.

Η αποικοδόμηση, ή αλλιώς ο καταβολισμός του γλυκογόνου, προς παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης, απαιτεί τη συνεργασία αρκετών ενζύμων πέρα από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η δραστηριότητα καθενός ενζύμου θα αναλυθεί παρακάτω:

➤ Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

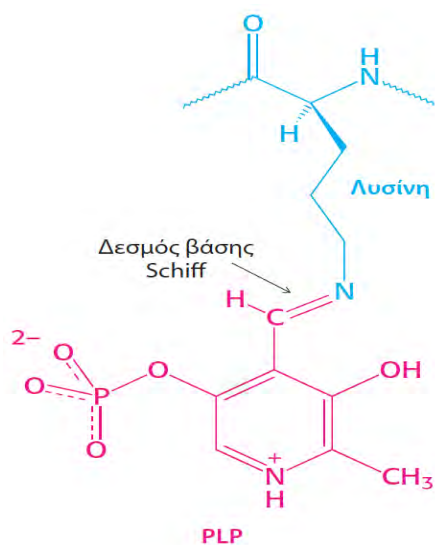
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μία τρανσφεράση. Είναι ένα ομοδιμερές (97.500Da) που αποτελείται από 836 αμινοξέα και αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο για τον καταβολισμό του γλυκογόνου. Καταλύει την αντίδραση της φωσφορύλωσης, διασπώντας το υπόστρωμα (γλυκογόνο) με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού Ρίπρος απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης, όπως δείχνει η εικόνα 4.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου, δηλαδή τα άκρα με ελεύθερη υδροξυλομάδα. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 του τελικού καταλοίπου και του C-4 του γειτονικού διασπάται από το Ρi, ώστε τελικά να σχηματιστεί 1-φωσφορική γλυκόζη και το μόριο του γλυκογόνου κατά ένα κατάλοιπο γλυκόζης λιγότερο. [12]

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*, όπως φαίνεται και στην εικόνα 4. Όμως *in vivo*, η φωσφορόλυση προχωρεί προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης, διότι ο λόγος [Pi] / [1-φωσφορική γλυκόζη] είναι συνήθως μεγαλύτερος του 100 και έτσι, ευνοείται η μετατόπιση προς τα δεξιά, δηλαδή η φωσφορόλυση – αποικοδόμηση. Αυτό αποτελεί και ένα λόγο για τον οποίο η φωσφορολυτική διάσπαση πλεονεκτεί ενεργειακά (**ενεργειακό πλεονέκτημα**) της υδρολυτικής διάσπασης που θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. [13] Παρακάτω θα αναλυθεί διεξοδικώς τόσο η κρυσταλλική δομή της όσο και οι αλλοστερικές της αλληλεπιδράσεις.

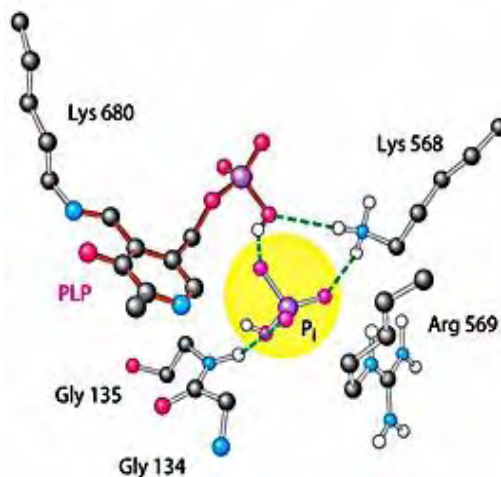
ΕΙΚΟΝΑ 5: Η χημική δομή της φωσφορικής πυριδοξάλης.



➤ Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

Η φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και είναι απαραίτητος συμπαράγοντας - συνένζυμο για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης και είναι συνδεδεμένη με τη Lys680 της πεπτιδικής αλληλουχίας του γλυκογόνου. Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου *PLP* σχηματίζει μία βάση *Schiff* με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 568 στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης (εικόνα 5). [16] Η διάσπαση του γλυκογόνου φωσφορολυτικά, η οποία υπερτερεί ενεργειακά έναντι της υδρολυτικής διάσπασης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Όσον αφορά τη συμμετοχή της *PLP* στην αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* λειτουργεί υπό μορφή διανιόντος ως δότης/δέκτης πρωτονίων σύμφωνα με το γενικό σχήμα της οξεοβασικής κατάλυσης.

ΕΙΚΟΝΑ 6:



Όταν η αντίδραση προχωράει προς τη φωσφορόλυση του α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού, το πρώτο βήμα είναι η πρωτονίωση του οξυγόνου του γλυκοζιδίου από ορθοφωσφορικό Pi ή πιο απλά η προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα

γλυκόζη (εικόνα 8: με μαύρο χρώμα). Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μία θέση μεταξύ της *PLP* και του υποστρώματος γλυκογόνου (εικόνα 6). [16], [17] Το καρβοκατιόν που σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της παραπάνω πρωτονίωσης, σταθεροποιείται από το φωσφορικό ανιόν. Η επακόλουθη ομοιοπολική πρόσδεση του φωσφορικού, οδηγεί στο σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία απελευθερώνεται έπειτα από τη διάσπαση, μαζί με το μόριο του γλυκογόνου κατά ένα κατάλοιπο λιγότερο.

Όταν η αντίδραση συμβαίνει προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή προς τη σύνθεση των υδατανθράκων, η πρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της 1-φωσφορικής γλυκόζης αποσταθεροποιεί το γλυκοζιτικό δεσμό και αυτό ευνοεί το σχηματισμό του ζεύγους γλυκοζυλο-καρβοκατιόν με το φωσφορικό ανιόν. Το φωσφορικό ανιόν διευκολύνει ουσιαστικά την πυρηνόφιλη προσβολή του τελευταίου κατάλοιπου του γλυκοζιδίου στο καρβονικό ιόν. Κατά αυτόν τον τρόπο, σχηματίζεται ο α-1,4 γλυκοζιτικός δεσμός και αυξάνεται ο αριθμός των γλυκοζιτικών καταλοίπων στον αρχικό πολυσακχαρίτη. Η φωσφορική ομάδα της *PLP* και του υποστρώματος προσεγγίζουν η μία την άλλη σε απόσταση ενός δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτή η μεταφορά πρωτονίων και έτσι, η 5' φωσφορική ομάδα της *PLP* να λειτουργεί ως μεταφορέας πρωτονίων που επαναφορτίζει το φωσφορικό ανιόν του υποστρώματος γλυκογόνου. [19]

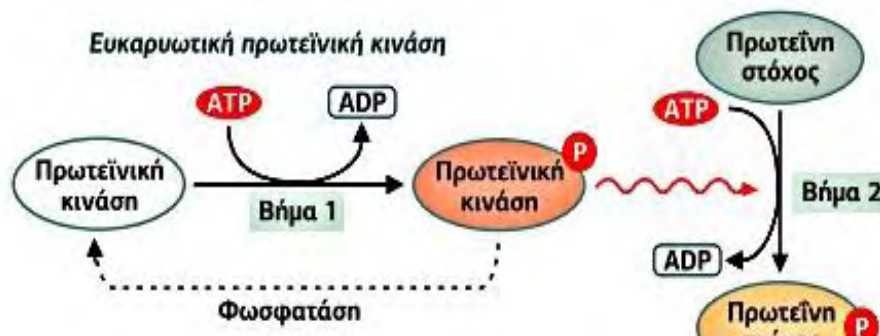
➤ Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η **κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*Phk*)** είναι το ένζυμο που ανταποκρίνεται σε ορμονικά σήματα προκειμένου να ενεργοποιήσει τη γλυκογονόλυση, μέσω φωσφορυλίωσης της *GP-β* (ανενεργός) και μετατροπής της σε *GP-α* (ενεργός), η οποία μπορεί να ξεκινήσει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Η *Phk* αποτελεί κεντρικό σημείο ελέγχου του μεταβολισμού του γλυκογόνου όπως θα αναλυθεί περαιτέρω παρακάτω.

Συγκεκριμένα, η *Phk* φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο *Ser*, τη *Ser14*, σε κάθε υπομονάδα της *GP-β*, η οποία μετατρέπεται στην *GP-α* που είναι ενεργός. Έπειτα, η ενεργός α-ισομορφή ξεκινά την αντίδραση της φωσφορόλυσης προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η *Phk*, όπως και η *GP*, ρυθμίζονται με δύο τρόπους:

- Είτε με αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.
- Είτε με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση.

Αυτή η σύνθετη ρύθμιση της δράσης τους οφείλεται στις μεγάλες μάζες της

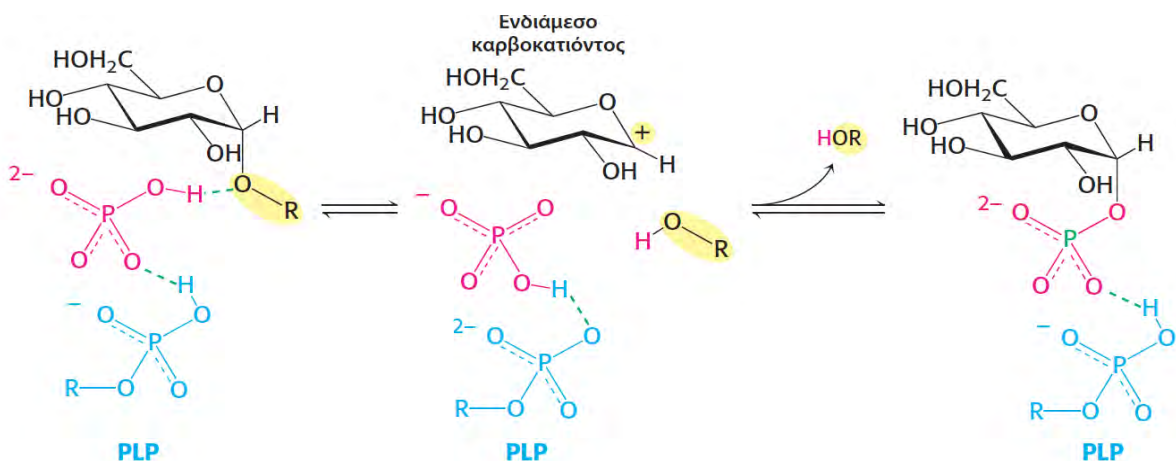


ΕΙΚΟΝΑ 7: Ένα γενικό σχήμα του καταλυτικού μηχανισμού δράσης των πρωτεϊνικών κινασών. [21]

πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας. Η *Phk* είναι ένα δεκαεξαμερές σύμπλοκο με 4αντίγραφα τεσσάρων διαφορετικών υπομονάδων (α,β,γ,δ) συνολικής μάζας 1.3MDa.

Η γ-υπομονάδα (44.7 kDa) είναι καταλυτική και οι υπόλοιπες υπομονάδες α (138.4 kDa), β (125.2 kDa) και δ (16.7 kDa) είναι ρυθμιστικές [22], με τη δ υπομονάδα να αποτελεί αισθητήρα ασβεστίου (ασβεστοτροποποιητίνη/καλμοδουλίνη). [23] Σε αντιδιαστολή με τις περισσότερες άλλες κινάσες, η *Phk* έχει μόνο έναν αναγνωρισμένο στόχο-υπόστρωμα, τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου *GP*. Επιπλέον, η *GP* είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνεται μόνο από την *Phk*, αποτελώντας ένα ασυνήθιστα εξειδικευμένο ζευγάρι κίνησης-υποστρώματος. Γνωρίζουμε ότι το N-αμινοτελικό άκρο της *GP*, το οποίο περιέχει και τη μονή θέση φωσφορυλίωσης στη σερίνη 14, πρέπει να προσδένεται στην ενεργή περιοχή της γ-υπομονάδας που φωσφορυλιώνεται, και η κρυσταλλική δομή της αποκομμένης γ-υπομονάδας με ένα πεπτιδικό υπόστρωμα αποκαλύπτει περαιτέρω λεπτομέρειες αυτής της πρόσδεσης. [25] Είναι αξιοσημείωτο ότι μελέτες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ *Phk* και *GP* έδειξαν ότι η φωσφορυλάση χωρίς την αμινοτελική περιοχή της, αλληλεπιδρά και δεσμεύεται με την *Phk* με την ίδια σχεδόν συγγένεια όπως και η φωσφορυλάση στην οποία δεν έχει αφαιρεθεί η αμινοτελική περιοχή [26], γεγονός που αναδεικνύει περισσότερες περιοχές αλληλεπίδρασης με την κινάση. Συστήματα δύο υβριδίων με χρήση ζυμομύκητα, μοριακή τεχνική που μελετά αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών σε *in vivo* συστήματα [27], ενίσχυσαν την πιθανότητα ότι η ρυθμιστική α-υπομονάδα της *Phk* ίσως αλληλεπιδρά με τη *GP*. [28] Η καλμοδουλίνη, η υπομονάδα δ της *Phk*, έχει επίσης δειχθεί ότι δεσμεύει ένα N-αμινοτελικό κομμάτι της *GP*. [29] Μόνο η β-υπομονάδα δεν είχε δειχθεί προηγουμένως ότι εμπλέκεται στη δέσμευση με την *GP*. Όμως, νέες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι οι ρυθμιστικές α και β υπομονάδες της *Phk* αλληλεπιδρούν απευθείας με το υπόστρωμά της, τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. [30]

ΕΙΚΟΝΑ 8: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με τη βοήθεια του συμπαραγόνα PLP. [18]



IV. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου: κρυσταλλική δομή και αλλοστερικός έλεγχος

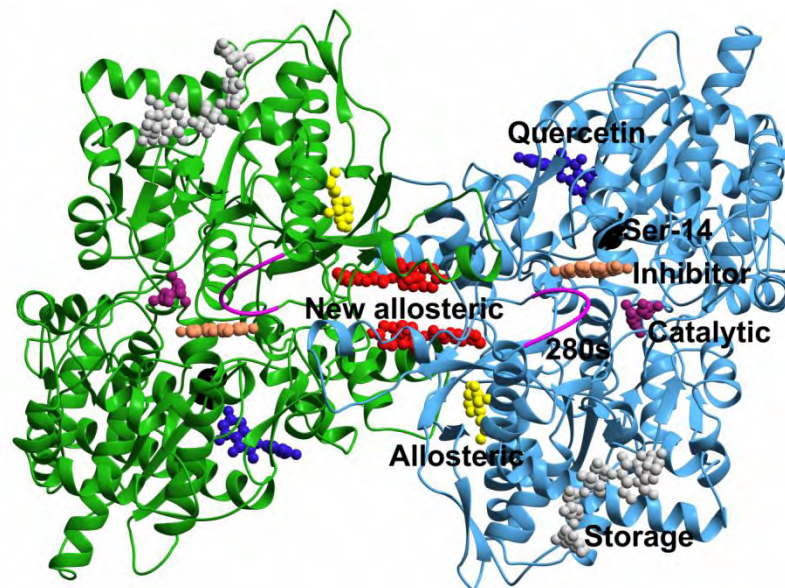
➤ Κρυσταλλική δομή

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελεί το κυριότερο ένζυμο για το μεταβολισμό του γλυκογόνου, με τη βοήθεια παράλληλα, του ενζύμου αποδιακλάδωσης και της φωσφογλυκομουτάσης. Αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την εύρεση φαρμάκων και αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων, με σκοπό τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. [34], [35]. Καταλύει την αντίδραση της φωσφορόλυσης, διασπώντας το υπόστρωμα (γλυκογόνο) με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού Ρίπρος απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (εικόνα 4). Υπάρχουν 3 ισομορφές της *GP* ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζονται, η μυϊκή, η ηπατική και η ισομορφή που εκφράζεται στον εγκέφαλο. Οι ισομορφές αυτές παρόλο που εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς μοιράζονται περίπου 80% ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας. Οι ιστοειδικές διαφορές μεταξύ της μυϊκής και της ηπατικής φωσφορυλάσης, οφείλονται σε διαφορές στην επιφάνεια της υπομονάδας και όχι σε μεταλλαγές των καταλοίπων που δεσμεύουν τους προσδέτες. Δεν υπάρχουν προσθήκες ή ελλείψεις στην αλληλουχία της ηπατικής ισομορφής συγκριτικά με τη μυϊκή, και από τις 171 αμινοξικές διαφορές μεταξύ των δύο ισομορφών τα 85 αμινοξέα (49%) είναι καλά συντηρημένα, ενώ οι περισσότερες αμινοξικές διαφορές είναι λειτουργικά ουδέτερες και η ενεργή περιοχή διατηρείται τόσο στην αμινοξική αλληλουχία όσο και στη δομή. [36], [37] Όσον αφορά την κρυσταλλική δομή της, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια διμερής α-β πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες. Η βιολογικά ενεργή *GP* (MB: 97,5 kDa, 842 κατάλοιπα αμινοξέων) είναι ένα ομοδιμερές με τη φωσφορική πυριδοξάλη να προσδέεται σε κάθε υπομονάδα μέσω μιας βάσης *Schiff* με τη *Lys* 680, λειτουργώντας ως συμπράγοντας. [37] Η *GP* αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 310 μήκους 6 και 12 καταλοίπων αντίστοιχα, και μια έλικα π μήκους 8 καταλοίπων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 έως 32 κατάλοιπα. Υπάρχει μια περιοχή 95 καταλοίπων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 καταλοίπων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των καταλοίπων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. [38] Τα κατάλοιπα 280-292 σχηματίζουν το βρόχο 280s και τα κατάλοιπα 1-18 σχηματίζουν το N-τελικό άκρο. [40] Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της *GP* αναδιπλώνεται σχηματίζοντας δυο επικράτειες: την επικράτεια 1 (κατάλοιπα 1-484) και την επικράτεια 2 (485-842) [41]. Η επικράτεια 2 περιέχει την ομοιοπολικά προσδεδεμένη φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) και ένα μέρος του ενεργού κέντρου. Αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μία θέση

μεταξύ της *PLP* και του υποστρώματος γλυκογόνου (εικόνα 6). Το ορθοφωσφορικό ιόν προσδένεται πολύ κοντά στην περιοχή που βρίσκεται η 5' φωσφορική ομάδα της *PLP*. Ενώ, η επικράτεια 1 που σχηματίζει το σύνολο της περιοχής της διεπαφής των 2 υπομονάδων, περιλαμβάνει το κέντρο σύνδεσης του *ATP/AMP*, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, ένα μέρος του ενεργού κέντρου και το κέντρο της φωσφορυλιωμένης *Ser14*. Το κέντρο αναστολής (στο οποίο κοντά βρίσκονται αρκετά κατάλοιπα, όπως η *Gly 135* και η *Leu 136*) εκτείνεται επίσης μεταξύ των δύο επικρατειών της *GP* [42], όπως και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [43].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει δηλαδή, τουλάχιστον 7 ρυθμιστικές περιοχές:

1. Θέση φωσφορυλίωσης στη *Ser 14*. [44]
2. Αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης, όπου προσδένεται το *AMP* (κέντρο πρόσδεσης του *AMP*). [45]
3. Καταλυτικό κέντρο όπου προσδένεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη. [46]
4. Το κέντρο της αποθήκευσης του γλυκογόνου. [47]
5. Το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη και παρόμοιες ενώσεις. [48]
6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο που αποτελεί θέση πρόσδεσης του εν δυνάμει αντιδιαβητικού φαρμάκου *CP320626*. [49]
7. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, το οποίο αποτελεί το πλέον πρόσφατο κέντρο που ανακαλύφθηκε. [50]



ΕΙΚΟΝΑ 9: Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής των δύο υπομονάδων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με τα κέντρα πρόσδεσης: Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η *Ser14*, με κίτρινο χρώμα το αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης του *AMP*, με μωβ χρώμα το κέντρο πρόσδεσης της γλυκόζης και της 1-φωσφορικής γλυκόζης, με γκρι χρώμα το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με σκούρο σομόν-κοραλλί χρώμα το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται ο αναστολέας, με κόκκινο χρώμα το νέο αλλοστερικό κέντρο και με μπλε χρώμα απεικονίζεται το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. Τέλος, με φουξ χρώμα απεικονίζεται ο βρόχος 280s.

1. Κέντρο της φωσφοσερίνης 14 (*Ser14*).

Βρίσκεται σε απόσταση περίπου 12 Å από το κέντρο πρόσδεσης του *AMP*. Η *Phk* φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο *Ser*, τη *Ser14*, σε κάθε υπομονάδα της *GP-β*, η οποία μετατρέπεται στην *GP-α* που είναι η ενεργός φωσφορυλάση.

2. Αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης (κέντρο πρόσδεσης του *AMP*).

Το αλλοστερικό κέντρο της *GP* απέχει περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελείται από δομικά στοιχεία από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερις β κλώνοι (κατάλοιπα 153-160, 191 193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V η οποία κλείνει από μία περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36' έως 47 της συμμετρικής υπομονάδας, και σχηματίζεται το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αυτό αναγνωρίζει μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως *AMP*, *IMP*, *ATP*, γλυκόζη-6-P, *NADH*, *UDP-γλυκόζη*, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφορικό. Η 6- φωσφορική γλυκόζη είναι ο πιο ισχυρός φυσιολογικός αναστολέας της *GPb* ($K_d = 20-70 \mu\text{M}$ για *GPb*, $K_d = 1700 \mu\text{M}$ *GPa*) που δεσμεύεται στο αλλοστερικό κέντρο. Η σύνδεση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε ανταγωνίζοντας την *AMP* που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση T του ενζύμου. [51] Πιο συγκεκριμένα, η *AMP* και η *IMP* ενεργοποιούν την *GPb* με την *AMP* να είναι ισχυρότερος ενεργοποιητής από την *IMP*. Αντίθετα, η *ATP*, η 6-φωσφορική γλυκόζη και η *UDP-γλυκόζη* αναστέλλουν το ένζυμο σταθεροποιώντας το στην T-στερεοδιαμόρφωση, κάτι το οποίο δηλώνει ότι η μετάπτωση της *GPb* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυοκυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η *GPb* είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της *ATP* και της 6-φωσφορικής γλυκόζης, έτσι σε μύες που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή *GPb*. Όταν αρχίζει η άσκηση η αυξημένη παραγωγή *AMP* ενεργοποιεί την *GPb* και παράλληλα απελευθερώνεται η ορμόνη που προκαλεί τη δημιουργία *GPa*. Η πρόσδεση της *AMP* στην *GPb* οδηγεί στο σχηματισμό τετραμερούς. [52]

3. Καταλυτικό κέντρο όπου προσδέεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη.

Η αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου έχει μελετηθεί από την πρόσδεση της γλυκόζης, η οποία εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε ως ένωση οδηγός για την παρασκευή αναλόγων γλυκόζης. [53] Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας μακριά από την περιοχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο υπομονάδων του λειτουργικού διμερούς, ωστόσο συνδέεται με αυτό μέσω του βρόχου 280s. Το κέντρο αυτό είναι θαμμένο σε απόσταση περίπου 15 Å από τον κύριο όγκο που καταλαμβάνει ο διαλύτης που βρίσκεται στη βάση μιας στενής διόδου, που σχηματίζεται από την επιφάνεια των δύο περιοχών της κάθε υπομονάδας, και κοντά στον απαραίτητο συμπάραγοντα φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). [54] Η πρόσδεση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με τα κατάλοιπα *His377*, *Glu672*, *Gly675*, *Asn484*, *Leu136*, *Asn284*, *Ala673*, *Ser674*, *Leu139*, *Val455*, *Gly135* καθώς και με ένα δίκτυο μορίων ύδατος, τα οποία δημιουργούν μια γέφυρα μεταξύ των ατόμων της γλυκόζης και των γειτονικών αμινοξέων. Η αναστολή που προκαλεί η γλυκόζη και τα ανάλογά της, οφείλεται στη μετακίνηση του βρόχου 280s στην κλειστή διαμόρφωση και στη σταθεροποίηση της T-στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου. [55]

4. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.

Αυτό το κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της GP περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή όπου συνδέεται το γλυκογόνο *in vivo*. Το κέντρο αποτελείται από δύο έλικες (κατάλοιπα 396 έως 418 και 420 έως 429) και ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430 έως 432 και κατάλοιπα 437 έως 411). Οι διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές, ωστόσο γνωρίζουμε ότι το κέντρο αυτό τοποθετεί το ένζυμο στην επιφάνεια του γλυκογόνου και προάγει το σχηματισμό ενεργών διμερών του ενζύμου όταν προσδεθεί το γλυκογόνο ή κάποιος ολιγοσακχαρίτης. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου επηρεάζει επίσης και τη δραστηριότητα του ενζύμου αλλά δεν

έχουν βρεθεί προς το παρόν ενώσεις που να συνδέονται στο κέντρο αυτό και να αναστέλλουν σημαντικά το ένζυμο. Ωστόσο οι α - β - και γ - κυκλοδεξτρίνες, που συνδέονται στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, χαρακτηρίστηκαν ως μικτού τύπου συναγωνιστικοί αναστολείς (ως προς το γλυκογόνο) έναντι της *GPb* με σταθερές αναστολής 47.1 mM, 14.1 mM και 7.4 mM αντίστοιχα. [56]

5. Το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη και παρόμοιες ενώσεις.

Απέχει 12Å από το καταλυτικό κέντρο. Ένα από τα πιο γνωστά μόρια που προσδένεται στο κέντρο αυτό είναι η καφεΐνη η οποία έχει μια σταθερά αναστολής 0.13 mM (*GPb*) και 0.17 mM (*GPa*). [57], [58] Η σύνδεση του προσδέτη στο κέντρο αναστολής γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και των πλευρικών αλυσίδων δύο αρωματικών καταλοίπων. Ένας άλλος γνωστός προσδέτης του κέντρου αναστολής είναι η φλαβοπυριδόλη, η οποία είναι ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (αναστολέας της *CDK2*). Η φλαβοπυριδόλη δρα συνεργιστικά με την γλυκόζη σταθεροποιώντας την T-στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου με τη μετατόπιση του βρόχου 280s από τη διαμόρφωση που επιτρέπει την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο στην R-στερεοδιαμόρφωση σε μια που την αποκλείει. [59]

6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο.

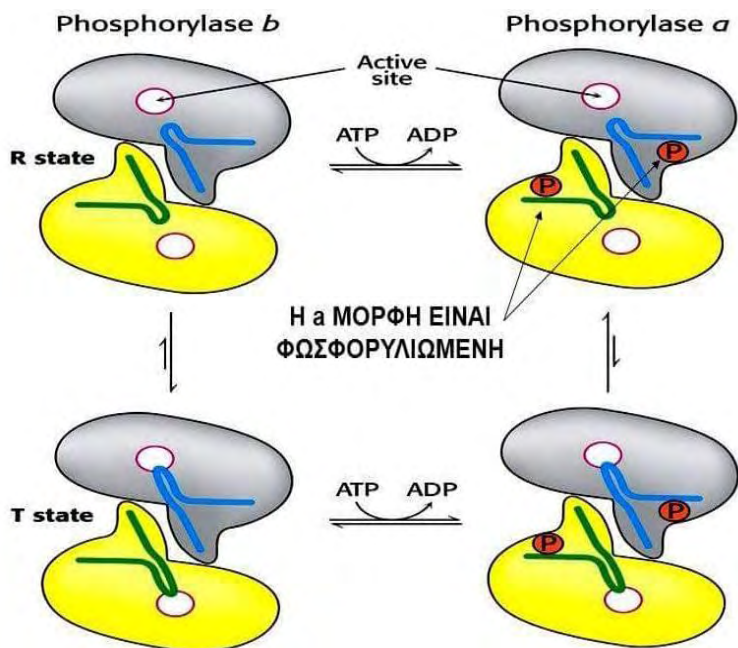
Ανακαλύφθηκετο 2000 από την ομάδα του Δρ Ν. Οικονομάκου [60] κατά την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης της χημικής ένωσης *CP320626* στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ο *CP320626* προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο στην κεντρική κοιλότητα που υπάρχει μεταξύ των δύο υπομονάδων του ενζύμου και μέχρι την συγκεκριμένη ερευνητική εργασία δεν είχε γίνει προηγούμενη αναφορά για σύνδεση κάποιου προσδέτη στο συγκεκριμένο κέντρο. Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται σε απόσταση 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Η κεντρική κοιλότητα έχει μήκος περίπου 30 Å με μια ακτίνα που ποικίλει από ~4 Å έως ~8 Å (*Arg33*, *His34*, *Arg60*, *Asp61* και τα σχετικά συμμετρικά κατάλοιπα).

7. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (εικόνα 9) ανακαλύφθηκε πρόσφατα από στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας [61]. Δομικές μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ αποκάλυψαν ότι η κερσετίνη προσδένεται σε ένα κέντρο της πρωτεΐνης που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της, σε απόσταση 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αυτό σχηματίζεται από τα κατάλοιπα *Lys544*, *Arg551*, *Lys655* και *Tyr548* της C-τελικής περιοχής και από τα κατάλοιπα *Glu120* και *Glu123* της N-τελικής περιοχής. [61] Η κερσετίνη αναστέλλει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου με IC_{50} 4.8 μM (*GPa*) και 20.9 μM (*GPb*) αντίστοιχα. [62]

➤ Η φωσφορυλάση ως αλλοστερικό ένζυμο

Η φωσφορυλάση είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που ακολουθεί το μοντέλο των *Monod*, *Wyman* και *Changeux* (*MWC*). [63] Σε αυτό το μοντέλο, γίνεται η παραδοχή ότι οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή από αποτελούνται από πανομοιότυπα μονομερή. Το ένζυμο μπορεί να έχει μια από τις δύο διαμορφώσεις: την *T* (*Tense*) και την *R* (*Relaxed*). [63] Έτσι ακριβώς και η φωσφορυλάση είναι ένα ένζυμο με δύο πανομοιότυπες υπομονάδες και μπορεί να βρεθεί είτε στην κατάσταση *T* είτε στην *R*. Η κατάσταση *R* είναι μια χαλαρή κατάσταση στην οποία το ένζυμο είναι ενεργό, διότι έχει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα σε αντίθεση με την κατάσταση *T* που έχει χαμηλότερη συγγένεια με το υπόστρωμα και είναι μια λιγότερο ενεργή τεταμένη κατάσταση του ενζύμου. Η θέση ισορροπίας της φωσφορυλάσης μεταξύ των καταστάσεων *T* και *R* εξαρτάται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου (Εικόνα 10).



ΕΙΚΟΝΑ 10: Αλλοστερική ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση *a* και η φωσφορυλάση *b* βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού κατάστασης *R* και μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης *T*. Η φωσφορυλάση *b* είναι συνήθως ανενεργός, διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση *T*, ενώ η φωσφορυλάση *a* είναι συνήθως ενεργός, διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση *R*. [64]

Θα εξετάσουμε τις διαφορές στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου σε δύο ιστούς: τους σκελετικούς μυς και το ήπαρ. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο ότι οι μύες χρησιμοποιούν τη γλυκόζη για να παράγουν ενέργεια για τον εαυτό τους, ενώ το ήπαρ διατηρεί την ομοιόσταση της γλυκόζης του οργανισμού ως σύνολο.

- Η **μυϊκή φωσφορυλάση** ρυθμίζεται από το ενεργειακό φορτίο. Στη θέση πρόσδεσης του αλλοστερικού τροποποιητή της φωσφορυλάσης μπορεί να προσδεθεί η *AMP*, η *ATP*, η 6-φωσφορική γλυκόζη, η 1-φωσφορική φρουκτόζη, η *ADP* και το *IMP*. Όλοι αυτοί οι αλλοστερικοί τροποποιητές που αντιπροσωπεύουν και φανερώνουν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου σταθεροποιούν την *T* κατάσταση εκτός της *AMP* που σταθεροποιεί την *R* και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση *b* από την *T*-κατάσταση στην *R*. Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων *AMP*, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση *R*. Η *ATP* δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, αναταγωνιζόμενος την *AMP*, ευνοώντας έτσι 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 (εικόνα 11).

ΕΙΚΟΝΑ 11:

Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης. Το χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της *AMP*, ευνοεί τη μετάβαση στην κατάσταση *R* και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση για να αποικοδομήσει το γλυκογόνο. [66]

γλυκόζης. Εκτός από το καταλυτικό κέντρο, στο στόχαστρο των ερευνών βρίσκονται και τα υπόλοιπα κέντρα του ενζύμου που αναλύθηκαν παραπάνω. Σήμερα, εκμεταλλευόμενοι τις γνωστές δομές των ενζύμων και με τη βοήθεια των ηλεκτρονικών υπολογιστών μπορούμε να σχεδιάσουμε φάρμακα τα οποία θα αναμένουμε να έχουν σημαντική δράση έναντι συγκεκριμένων κέντρων των ενζύμων. [69] Εκτός από τις ενώσεις που προέρχονται από οργανική σύνθεση, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αναστολείς ενζύμων οι οποίοι προέρχονται από φυτά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί ώστε με μικρές αλλαγές στη δομή τους, μέσω οργανικής σύνθεσης, να οδηγήσουν σε πιο εκλεκτικά φάρμακα ενάντια συγκεκριμένων στόχων.

V. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

➤ Κινητική Michaelis - Menten

Πριν από περίπου 100 χρόνια οι *Michaelis* και *Menten* έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, χρησιμοποιώντας την ιμπερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους.[70]

Για μία αντίδραση του τύπου (1), στην οποία ένα ένζυμο *E* αντιδρά με το υπόστρωμα *S* για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο *ES* με μία κινητική σταθερά k_1 . Στη συνέχεια, το σύμπλοκο *ES* μπορεί να ακολουθήσει δύο πορείες:

- Είτε να διασπαστεί σε *E* και *S* με μια κινητική σταθερά k_{-1}
- Είτε να σχηματίσει προϊόν *P* με μια κινητική σταθερά k_2 [71]



Για μια τέτοια ενζυμική αντίδραση, όπου *E*: ένζυμο, *S*: υπόστρωμα, *P*: προϊόν, *ES*: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, k_1 , k_{-1} , k_2 : σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων, οι *Michaelis* και *Menten* κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

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

Όπου:

[*S*]: η συγκέντρωση του υποστρώματος

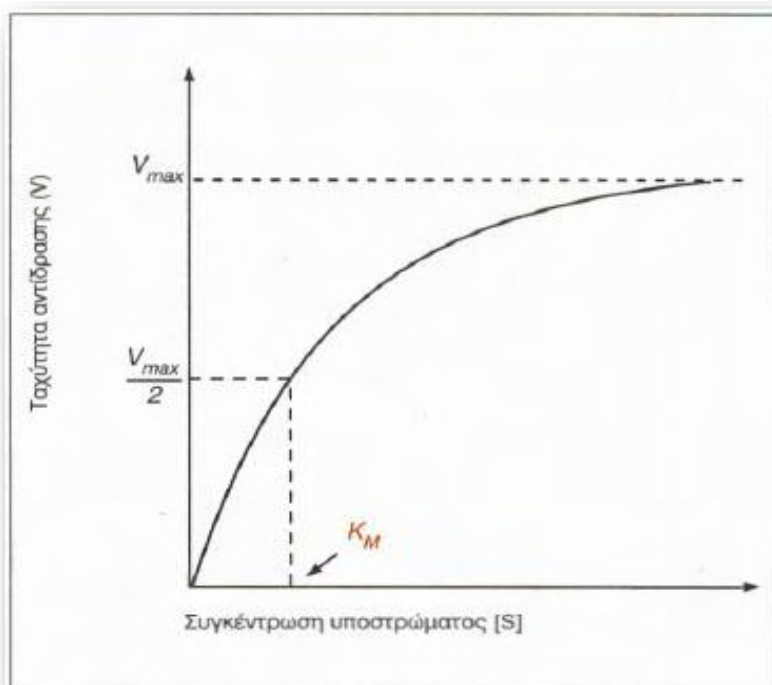
V_0 : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

K_M : σταθερά *Michaelis Menten* που ορίζεται ως: $K_M = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ και μας πληροφορεί για το βαθμό συγγένειας ενζύμου-υποστρώματος. Δηλαδή, όσο μικρότερη είναι η K_M τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια *E-S*. Εκφράζεται συνήθως σε μονάδες συγκέντρωσης, δηλαδή mol/l. [72]

Συνεπώς, αν θέλουμε να απεικονίσουμε σε μια καμπύλη τη σχέση της ταχύτητας V σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$, αυτή η καμπύλη θα έχει τη μορφή:

EIKONA 13: Καμπύλη *Michaelis-Menten*. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης V , πλησιάζει τη μέγιστη V_{max} .

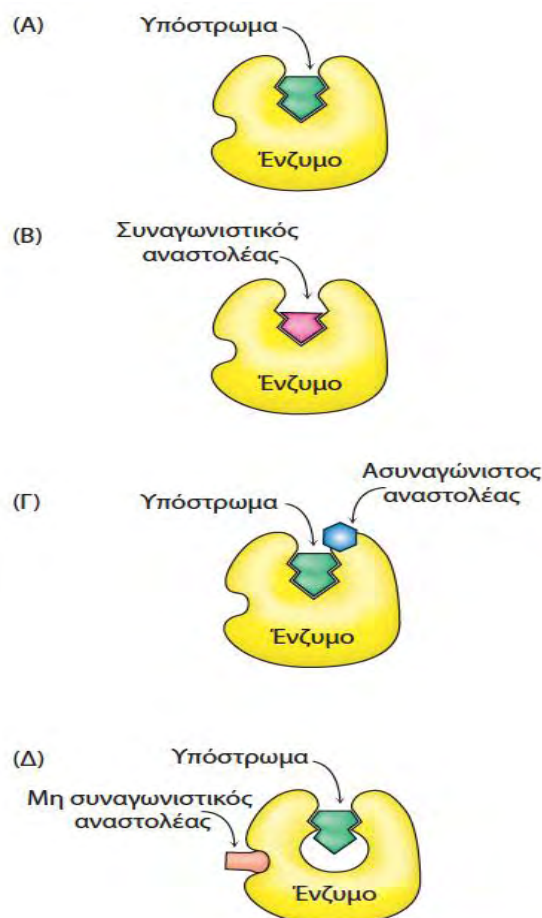


➤ Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Οποιαδήποτε ουσία ελαττώνει την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να θεωρηθεί σαν αναστολέας. Ένα ένζυμο διαθέτει μία θέση ενεργό κέντρο, θέσεις αλλοστερικής ενεργοποίησης και θέσεις αλλοστερικών αναστολέων, όλες διαφορετικές μεταξύ τους, σε διαφορετικά σημεία του ενζύμου. Πολλές φορές η αναστολή γίνεται από το ίδιο το προϊόν που αποδίδει το ένζυμο, δρώντας σαν συναγωνιστικός ή μερικώς συναγωνιστικός αναστολέας.

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 αυτό, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.

- Στη **συναγωνιστική αναστολή** το ένζυμο μπορεί να προσδένει είτε υπόστρωμα ή αναστολέα, αλλά όχι και τα δυο ταυτόχρονα. Ο συναγωνιστικός αναστολέας παρουσιάζει δομική ομοιότητα με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και έτσι το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Δηλαδή, ο συναγωνιστικός αναστολέας συναγωνίζεται την πρόσδεση του υποστρώματος στο ίδιο ενεργό κέντρο (εικόνα 14). Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το υπόστρωμα είναι αυτό που συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. [76]
- Στη **μη συναγωνιστική αναστολή**, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδέονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με την συναγωνιστική, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



ΕΙΚΟΝΑ 14:

Κατηγορίες αντιστρεπτών αναστολέων:

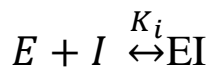
(Α) σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος.

(Β) συναγωνιστικός αναστολέας που προσδένεται στο ενεργό κέντρο.

(Γ) ασυναγώνιστος αναστολέας που προσδένεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος.

(Δ) μη συναγωνιστικός αναστολέας προσδένεται σε

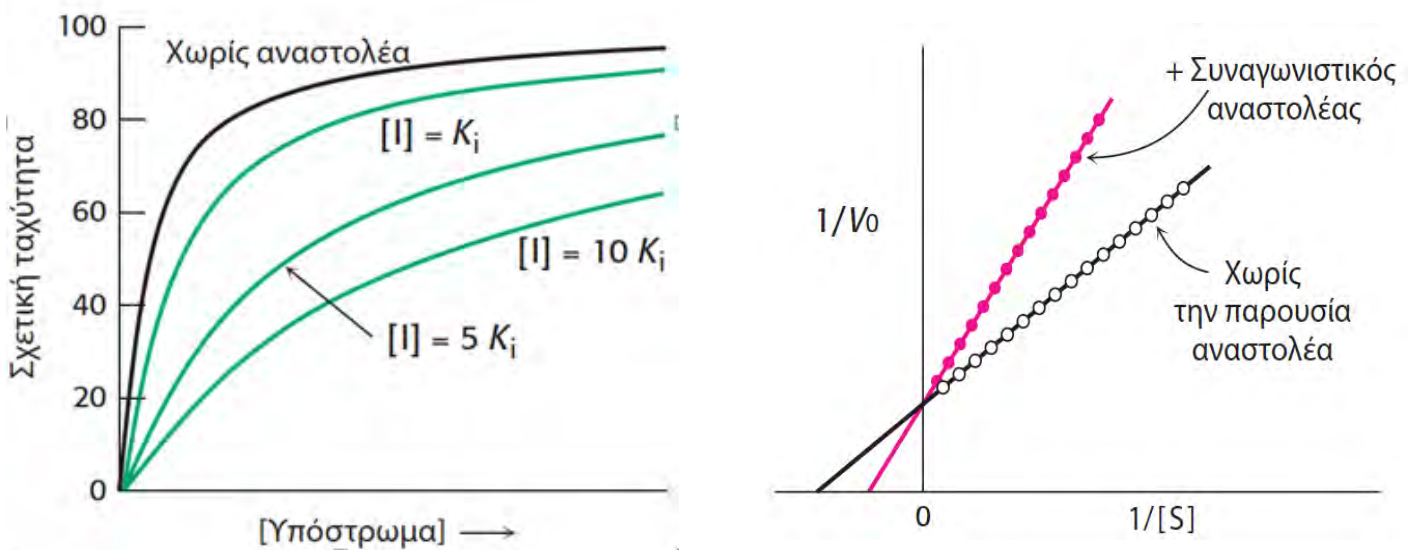
Η ισχύς ενός αναστολέα εκφράζεται με την σταθερά K_i :



Και η σταθερά υπολογίζεται από τον τύπο: $K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$

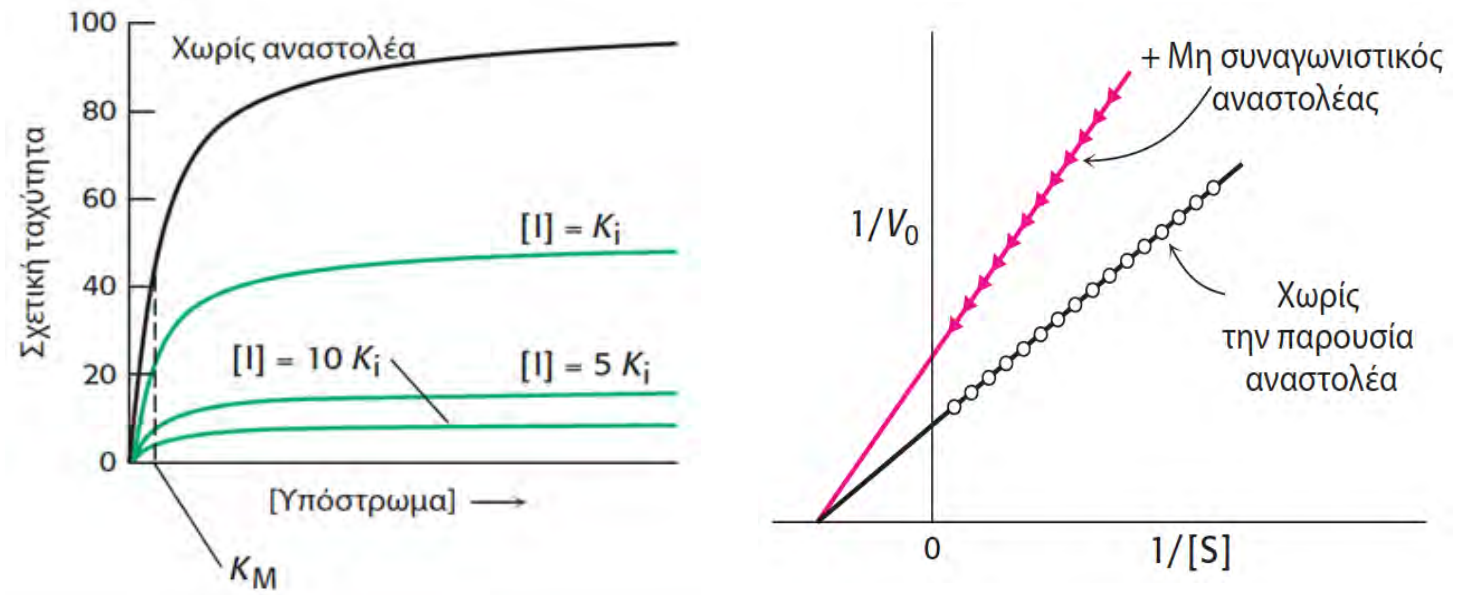
Όσον αφορά τα διαγράμματα της ταχύτητας V συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος $[S]$ και τα διαγράμματα διπλού αντιστρόφου για μία συναγωνιστική και μία μη συναγωνιστική αναστολή, έχουμε αντίστοιχα:

- **Συναγωνιστική αναστολή**



ΕΙΚΟΝΑ 15: *Αριστερά:* Διάγραμμα ταχύτητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υποστρώματος απουσία και παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη ενζυμική ταχύτητα. Εφόσον έχουμε αναστολέα, η K_m θα είναι πιο αυξημένη, καθώς ο αναστολέας θα συναγωνίζεται για την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο και άρα έτσι θα μειώνει τη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. *Δεξιά:* Ένα διάγραμμα διπλού αντιστρόφου από το οποίο υπολογίζονται οι κινητικές σταθερές απουσία και παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα. Παρατηρούμε ότι ο αναστολέας δεν επιδρά στη V_{max} (σταθερή), αλλά αυξάνει την K_m . Επιπλέον, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα $[I]$, η ευθεία μετατοπίζεται προς τον άξονα y '.

- **Μη συναγωνιστική αναστολή**



ΕΙΚΟΝΑ 16: *Αριστερά:* Διάγραμμα ταχύτητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υποστρώματος απουσία και παρουσία ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Παρατηρούμε ότι η K_m παραμένει σταθερή και αμετάβλητη, καθώς το υπόστρωμα θα προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, χωρίς να το επηρεάζει η πρόσδεση του αναστολέα, αφού αυτός προσδένεται σε κάποια άλλη θέση πάνω στο ένζυμο. Επιπλέον, επειδή ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος, η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή V_{max} . *Δεξιά:* Ένα διάγραμμα διπλού αντιστρόφου από το οποίο υπολογίζονται οι κινητικές σταθερές απουσία και παρουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα. Η K_m δε μεταβάλλεται, ενώ η V_{max} ελαττώνεται.

VI. Υγρή χρωματογραφία στήλης - Χρωματογραφία συγγένειας - Σύστημα FPLC

Η χρωματογραφία συγγένειας αξιοποιεί τα φαινόμενα βιο-αναγνώρισης υψηλής εξειδίκευσης και είναι μια τεχνική ιδανική για τον καθαρισμό βιομορίων. Στο συγκεκριμένο τύπο χρωματογραφίας, το αδιάλυτο υλικό της μήτρας της στήλης διαθέτει ειδικές ικανότητες προσρόφησης που οφείλονται σε ομοιοπολική σύνδεση προσδέτη, ο οποίος έχει συγγένεια ως προς το βιομόριο στόχο και συνδέεται με αυτό. Όταν ένα δείγμα, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη στόχο, περάσει μέσα από μια στήλη που έχει έναν ακινητοποιημένο προσδέτη, τότε όλοι οι παράγοντες που εμφανίζουν κάποια συγγένεια, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος, θα

παραμείνουν στη στήλη, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες που δεν έχουν συγγένεια θα περάσουν από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν (*flow through*). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη στόχος που έχει συνδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη, θα αποσυνδεθεί από αυτόν μέσω κάποιας αλλαγής στις πειραματικές συνθήκες, όπως αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος, της σύστασης του διαλύματος και της θερμοκρασίας ή προσθέτοντας κάποιον ανταγωνιστικό προσδέτη για το υλικό της στήλης. [77] Σε όλη τη διαδικασία του καθαρισμού, υπάρχει φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο μετράει την απορρόφηση του διαλύματος που εξέρχεται από τη στήλη και το αποτέλεσμα καταγράφεται με τη μορφή χρωματογραφήματος, το οποίο είναι παρατηρούμενο σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που συνδέεται με το μηχάνημα χρωματογραφίας (*Äkta Purifier-FPLC*). Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να αναλυθεί σε βήματα όπως:

1. Εξισορρόπηση: Το υλικό της στήλης εξισορροπείται με το διάλυμα όπου θέλουμε να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης (διάλυμα πρόσδεσης). Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι κατά την εξισορρόπηση δεν υπάρχει συνδεδεμένο κάτι στο υλικό της στήλης, εκτός από τον ακινητοποιημένο προσδέτη, με αποτέλεσμα η απορρόφηση του εξερχόμενου διαλύματος από τη στήλη να είναι σταθερή. Στο στάδιο αυτό η απορρόφηση που εμφανίζεται στο UV οφείλεται στα συστατικά του διαλύματος πρόσδεσης.

2. Εισαγωγή δείγματος: Το δείγμα (συνήθως κυτταρόλυμα) εισέρχεται στη στήλη, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την ειδική, αλλά αντιστρεπτή, σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στο υλικό της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια, λόγω της πρόσδεσης ενός ακινητοποιημένου προσδέτη. Τα επιπλέον συστατικά του κυτταροπλάσματος που δεν συνδέονται απομακρύνονται από τη στήλη με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του UV (*Flow through*).

3. Έκπλυση: Όταν εισαχθεί όλο το δείγμα, τότε γίνεται έκπλυση της στήλης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες και να μείνει μόνο η πρωτεΐνη/ες που εμφανίζει/ζουν υψηλή συγγένεια για τον ακινητοποιημένο προσδέτη. Αυτό οδηγεί σε μείωση και σταθεροποίηση της απορρόφησης του UV, επειδή οι πρωτεΐνες που εξέρχονται από τη στήλη μειώνονται μέχρι να σταματήσουν να απομακρύνονται άλλες. Η έκπλυση της στήλης γίνεται συνήθως με 10 όγκους στήλης από το διάλυμα έκπλυσης.

4. Έκλουση: Αφού λοιπόν η απορρόφηση μείνει σταθερή για κάποιους όγκους στήλης, τότε εφαρμόζουμε το διάλυμα έκλουσης. Η έκλουση μπορεί να γίνει είτε με εφαρμογή 100 % του διαλύματος έκλουσης, είτε με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του (διαβάθμιση συγκέντρωσης), κάτι το οποίο οδηγεί σε απομάκρυνση της πρωτεΐνης που έχει μείνει συνδεδεμένη στο υλικό της στήλης. Το αποτέλεσμα είναι η συλλογή της πρωτεΐνης στόχου η οποία είναι πλέον σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

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

➤ Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{2+}

Μία μεγάλη κατηγορία στη χρωματογραφία συγγένειας, αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων πάνω σε σφαιρίδια αгарόξης ή σεφαρόξης (*Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC*). Η διαφορική συγγένεια των πρωτεϊνών για τα ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα προέρχεται από τους δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ των εμπλεκόμενων μεταλλικών ιόντων και των ομάδων δότες ηλεκτρονίων που υπάρχουν σε μερικά κατάλοιπα αμινοξέων (π.χ., *His, Cys, Trp και Arg*). Στο *IMAC*, αυτές οι ομάδες δότη ηλεκτρονίων σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων όπως Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , ή Ni^{2+} , τα οποία τυπικά είναι ακινητοποιημένα σε πολυμερή με ομάδες που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως ιμινοδιοξικό οξύ (*IDA*) ή νιτριλοτριοξικό οξύ (*NTA*). Η συγκράτηση πρωτεϊνών επί των σφαιριδίων *IMAC* επηρεάζεται από την φύση των χηλικών ομάδων, από το μεταλλικό ιόν και από την συγκέντρωση άλατος και του *pH*. Κάθε χηλική ομάδα παρουσιάζει τη δική της ικανότητα εκλεκτικότητας και προσρόφησης προς μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η **ιστιδίνη (*His*)** επιδεικνύει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με ακινητοποιημένα χηλικά χημικά μεταλλικά ιόντα, ως αποτέλεσμα η ετικέτα ολιγο-ιστιδίνης *His6* είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ετικέτες για τον καθαρισμό πρωτεΐνης (*His-tag*) και είναι η στήλη η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα πειραματική διαδικασία για τον καθαρισμό της *hIGP*, όπως θα αναλυθεί παρακάτω στο πειραματικό μέρος. Το *Ni(II)-nitrilo triacetic acid (Ni-NTA)* παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για γειτονικά κατάλοιπα ιστιδίνης και είναι μία από τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μήτρες *IMAC* για την δέσμευση της πρωτεΐνης-στόχου. [78]

Συνήθως, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες διαθέτουν τουλάχιστον 6 ιστιδίνες, η οποίες βρίσκονται είτε στο N-τελικό είτε στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και προσφέρουν μια υψηλή συγγένεια ως προς τα Ni^{2+} . Η έκλυση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση προσδετών που έχουν επίσης συγγένεια για το ακινητοποιημένο μέταλλο. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι το ιμιδαζόλιο (*Imdz*), το οποίο είναι όμοιο με τον δακτύλιο της ιστιδίνης. [79]

➤ Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής - Ion exchange chromatography (IEX)

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από N-τελικό και C-τελικό άκρο, καρβοξυλικές ομάδες από τις ασπάρτυλο και γλουτάμινο πλευρικές αλυσίδες, αμινομάδες από την

πλευρική αλυσίδα της λυσίνης, γουανιδική ομάδα από την πλευρική αλυσίδα της αργινίνης και μια ομάδα ιμιδαζολίου από την πλευρική αλυσίδα της ιστιδίνης. Αυτές οι ομάδες βρίσκονται στην επιφάνεια των σφαιρικών πρωτεϊνών. Η *IEX* εισήχθη στη δεκαετία του 1960 και εξακολουθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό και τον καθαρισμό βιομορίων. Σήμερα, η *IEX* είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων και άλλων φορτισμένων βιομορίων, προσφέροντας διαχωρισμούς υψηλής ανάλυσης. Η τεχνική είναι ικανή να διαχωρίζει μοριακά είδη που έχουν μόνο μικρές διαφορές στις ιδιότητες του φορτίου τους, για παράδειγμα δύο πρωτεΐνες που διαφέρουν κατά ένα φορτισμένο αμινοξύ. καθώς εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το *pH* επηρεάζει με μοναδικό τρόπο το καθαρό φορτίο της επιφάνειας κάθε πρωτεΐνης. Σε ένα τυπικό πείραμα χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και των αντίθετα φορτισμένων σφαιριδίων του υλικού της ρητίνης. Στο ισοηλεκτρικό σημείο (*pI*), το καθαρό φορτίο είναι μηδέν και επομένως η πρωτεΐνη δεν μπορεί να προσδεθεί στη στήλη. Σε *pH* πάνω από το *pI* αυξάνεται το καθαρό αρνητικό φορτίο και η πρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε υλικό που είναι θετικά φορτισμένο (ανιοανταλλάκτες) ενώ σε *pH* κάτω από το *pI* αυξάνεται το καθαρό θετικό φορτίο με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να προσδένεται σε αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια (κατιονοανταλλάκτες).

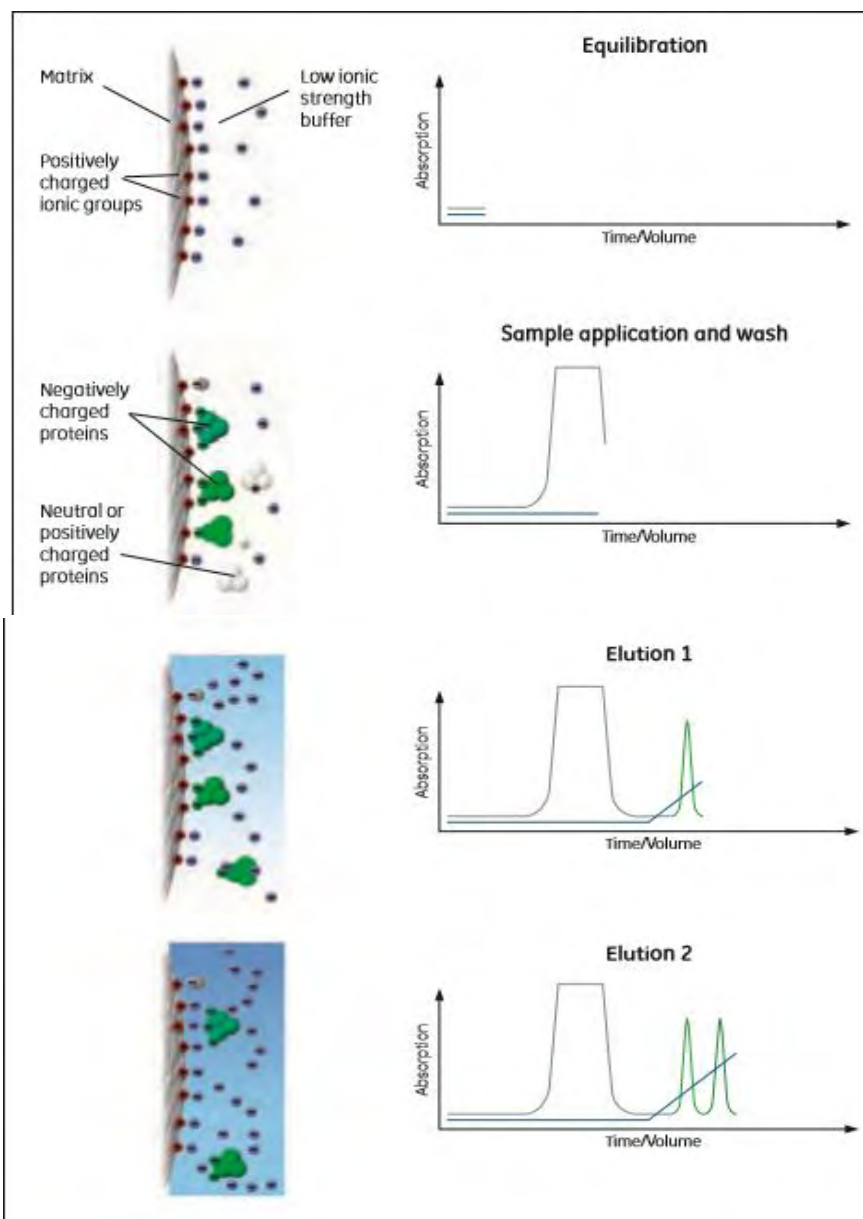
Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής μπορεί να περιγραφεί με τα εξής βήματα:

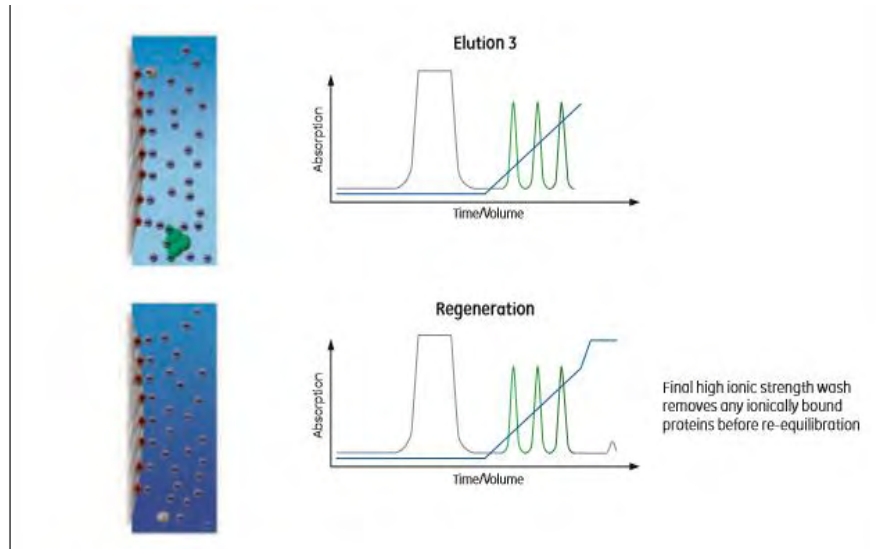
1. Το πρώτο βήμα είναι η **εξισορρόπηση** της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες. Όταν επιτυγχάνεται ισορροπία, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης είναι συνδεδεμένες αντιστρεπτά με ιόντα αντίθετου φορτίου, όπως χλωρίου (*Cl⁻*) ή νατρίου (*Na⁺*). Το *pH* και η ιοντική ισχύς του αρχικού διαλύματος επιλέγονται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι, όταν το δείγμα φορτώνεται, δεσμεύονται στην στήλη οι πρωτεΐνες-στόχος και απομακρύνονται όσο το δυνατόν οι ανεπιθύμητες.
2. Το δεύτερο βήμα είναι η **εφαρμογή του δείγματος και η έκπλυση**. Ο στόχος σε αυτό το βήμα είναι να δεσμευτεί/τούν στην στήλη η/οι πρωτεΐνη/νες στόχος και να απομακρυνθούν με έκπλυση της στήλης όλες οι προσμίξεις που δεν συνδέονται σε αυτή. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα θα πρέπει να έχει το ίδιο *pH* και ιοντική ισχύ με το αρχικό διάλυμα ώστε να δεσμεύει όλες τις φορτισμένες πρωτεΐνες-στόχο.

Έκλυση: Αφού γίνει η εισαγωγή του δείγματος και η πλύση της στήλης, τότε ακολουθεί η έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών συνήθως με αύξηση της ιοντικής ισχύος (αύξηση στη συγκέντρωση άλατος) ή με αλλαγή του *pH* του διαλύματος έκλυσης. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα άλατος (τυπικά *Na⁺* ή *Cl⁻*) ανταγωνίζονται τους προσδεδεμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και σιγά σιγά οι προσδεδεμένοι παράγοντες αρχίζουν να αποσυνδέονται και να εκλύονται από τη στήλη, καθώς η ιοντική ισχύς συνεχίζει να αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο

επιλεγμένο pH θα είναι οι πρώτες που εκλύονται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο σε ένα ορισμένο pH θα συγκρατηθούν πολύ και θα εκλουστούν στο τέλος. Όσο υψηλότερο είναι το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ισχύς που απαιτείται για την έκλυση.

Αναγέννηση: Μια τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος αναγεννά τη στήλη και απομακρύνει τα μόρια που εξακολουθούν να συνδέονται. Αυτό οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τέλος, η στήλη επαναεξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ξανά.





Εικόνα 19:Χρωματογράφημα χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής. (Από πάνω προς τα κάτω). Η στήλη έχει εξισορροπηθεί με το αρχικό διάλυμα (διάλυμα εξισορρόπησης). Αντίθετα φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται σε ιοντικές ομάδες της στήλης. Οι μη φορτισμένες πρωτεΐνες ή εκείνες με το ίδιο φορτίο εκλύονται κατά την εφαρμογή του δείγματος ή αμέσως μετά, κατά τη διάρκεια της έκπλυσης. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος εκλύει δεσμευμένες πρωτεΐνες καθώς τα ιόντα στο ρυθμιστικό περιβάλλον ανταγωνίζονται για θέσεις πρόσδεσης. Περαιτέρω αύξηση στην ιοντική ισχύ εκτοπίζουν πρωτεΐνες που είναι περισσότερο φορτισμένες (πιο στενά συνδεδεμένες). Η τελική έκπλυση της στήλης με υψηλή ιοντική ισχύ αφαιρεί οποιοσδήποτε ιοντικά δεσμευμένες πρωτεΐνες πριν από την επανεξισορρόπηση.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η στήλη **Resource Q** για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης *hlGP*, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. 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*). [80]

➤ Αφαίρεση της ετικέτας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι ετικέτες συγγένειας έχουν καταστεί βασικά εργαλεία για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Όχι μόνο διευκολύνουν την ανίχνευση και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, όπως είχαν αρχικά προβλεφθεί, αλλά μπορούν επίσης να έχουν επωφελή επίδραση στην απόδοση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να αυξήσουν τη διαλυτότητά τους και ακόμη και να προωθήσουν την ορθή τους αναδίπλωση. Έχουν σχεδιαστεί πολλές μέθοδοι για την απομάκρυνση τους από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένες ενδοπρωτεάσες που αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Οι ενδοπρωτεάσες αυτές μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν με χρωματογραφία συγγένειας, εφόσον διαθέτουν οι ίδιες κάποια ετικέτα συγγένειας. Από τις πιο γνωστές πρωτεάσες είναι η θρομβίνη, η *TEV* και η 3C. [81] Η πρωτεάση *TEV* έχει μοριακό βάρος 49 *kDa* και η καταλυτική της ιδιότητα οφείλεται στο C-τελικό της τμήμα το οποίο έχει μοριακό βάρος 27 *kDa*. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση *TEV* είναι *Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln↓Ser/Gly*, όπου *Xaa* δηλώνει την παρουσία οποιουδήποτε αμινοξέος. Η *TEV* πρωτεάση έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την απομάκρυνση

ετικετών συγγένειας με ιστιδίνες, διότι η καταλυτική C-τελική περιοχή της έχει εισαχθεί σε φορέα έκφρασης που προσδίδει ετικέτα ιστιδινών. Ωστόσο, σήμερα η πρωτεάση *TEV* υπάρχει και με ετικέτα *GST* αλλά και με τις δύο ετικέτες.

VII. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE

Στις περισσότερες εργαστηριακές μελέτες που σχετίζονται με τη μελέτη και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή τεχνική που μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος, το φορτίο, τον ολιγομερισμό και την καθαρότητα μια πρωτεΐνης καθώς επίσης και την ποσοτική ανάλυση των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες *daltons* στο μοριακό τους βάρος και κατά 0.1 μονάδα του *pH* στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει πολλές τεχνικές με την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) να αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η μέθοδος *SDS-PAGE* εφαρμόζεται συχνά στα κλάσματα που προέρχονται από τη χρωματογραφία πρωτεϊνών ώστε να γίνει μια οπτική παρατήρηση των προσμίξεων που υπάρχουν στο κάθε κλάσμα αλλά και για την αξιολόγηση της καθαρότητας της πρωτεΐνης που εισήχθη στη στήλη, μιας και κάθε συστατικό θα διατρέξει το πήκτωμα και θα διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό του βάρος.

Κάποιες από τις υπόλοιπες μεθόδους ηλεκτροφόρησης είναι:

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

Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα, μιας και αυτό είναι που καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αгарόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 *kDa*.

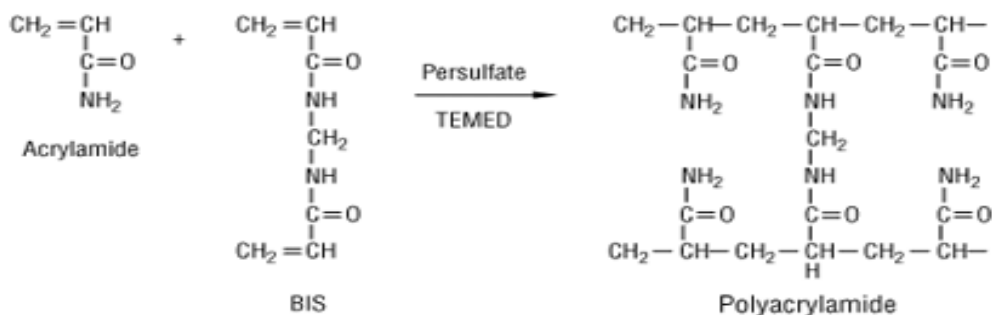
Η πολυακρυλαμίδη έχει κάποια χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, όπως:

1. Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
2. Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη. Συμμετέχει η *bis*-ακρυλαμίδη, το *APS* και το αντιδραστήριο *TEMED* (εικόνα 20).

3. Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς.

4. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται.

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

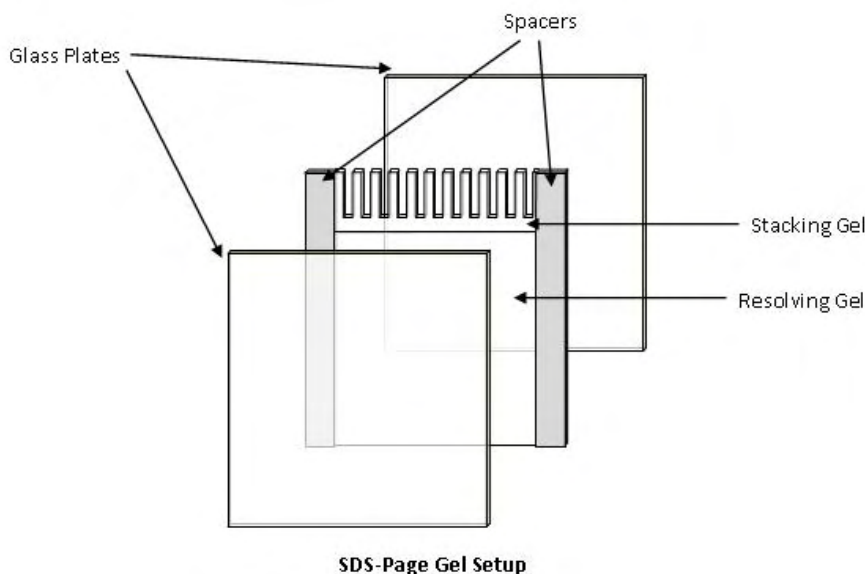


Εικόνα 10: Αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου κατά το σχηματισμό πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το *N'*-*N*'methylbisacrylamide (*bis*) και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μια μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με μόριο *bis* ακρυλαμιδίου όπως φαίνεται στην εικόνα 19. Έτσι, σχηματίζεται ένα στερεό πηκτώμα, του οποίου οι ίνες που έχουν δημιουργηθεί συγκρατούν τον διαλύτη στο εσωτερικό του πηκτώματος ο οποίος είναι απαραίτητος για την διατήρηση του τρισδιάστατου σχήματος του πηκτώματος. Η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για την έναρξη του πολυμερισμού και δημιουργούνται από την παρουσία *ammoniumpersulfate* και *N, N, N', N'*tetramethylethylenediamine (*TEMED*). Το *TEMED* επιταχύνει την μετατροπή το *APS* σε ελεύθερες ρίζες θείου οι οποίες είναι αυτές που ξεκινούν τον πολυμερισμό με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκαλικό pH. Ο ρυθμός του πολυμερισμού, όμως, εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την καθαρότητα των αντιδραστηρίων και την συγκέντρωση των μονομερών (ακρυλαμίδιο και *bis* ακρυλαμίδιο) που συμμετέχουν στην αντίδραση πολυμερισμού. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τον πολυμερισμό είναι το οξυγόνο το οποίο είναι προτιμότερο να απομακρύνεται από τα διαλύματα με απαέρωση. Ωστόσο, καλής ποιότητας πηκτώματα παράγονται και χωρίς να έχει προηγηθεί απαέρωση των διαλυμάτων. [83]

Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοιβάξης (εικόνα 20). Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

(*runningbuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS*) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος.



Εικόνα 21: Κατασκευή συσκευής ηλεκτροφόρησης

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

10%		
Συστατικά	Επιστοιβάξης 3 ml	Διαχωρισμού 5 ml
dH ₂ O	2.1	1.9
30% Acrylamide-mix	0.5	1.7
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1.3
Tris 1.0 M, pH 6.8	0.38	-
SDS (10%)	0.03	0.05
APS 10%	0.03	0.05
TEMED	0.003	0.002

Πίνακας 1: Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου διαφορετικής πυκνότητας.

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

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

διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή.

Το πήκτωμα που λαμβάνεται μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται σε διάλυμα οξικού οξέος και σε διάλυμα χρώσης που περιέχει τη χρωστική *Coomassie Blue R250* ώστε να μπορούν να παρατηρηθούν οι μπάντες των πρωτεϊνών που έχουν διαχωρισθεί.

VIII. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος *Bradford* (*Bradford* 1976) χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος *Bradford* είναι μια χρωματική μέθοδος που βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής *Commassie*, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης *BSA* γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μL από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προστίθενται 780 μL απιονισμένο ύδωρ και 200 μL αντιδραστηρίου *Bradford* 5x, έτσι ώστε να γίνει 1x. Τα διαλύματα (όγκου 1 mL) αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Έπειτα, γίνεται ανάδευση των διαλυμάτων και ακολουθεί η φασματοφωτομέτρησή τους σε μήκος κύματος 595 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με βάση την πρότυπη καμπύλη.

IX. Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες X

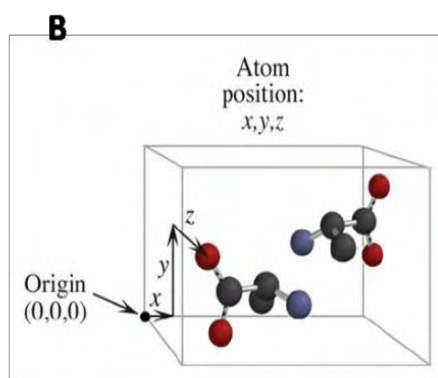
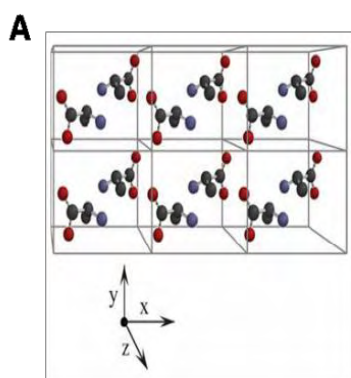
Η ακτινοβολία ακτίνων X αποτελεί μέρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος που κυμαίνεται μεταξύ 0.01 έως 10 nm. Η ακτινοβολία ακτίνων X έχει βοηθήσει στις προσπάθειες που γίνονται την τελευταία δεκαετία ώστε να καταδειχθεί η δομική βιολογία ως το κέντροδιαδικασίας εύρεσης νέων φαρμάκων. Τροχοπέδη στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X αποτελεί η χρήση πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Αυτό δυσκολεύει τις μελέτες, ειδικά όταν υπάρχουν μικρές ποσότητες από τον παράγοντα που θέλουμε να μελετήσουμε. Βέβαια, υπάρχουν και άλλες τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία μάζας και ο πυρηνικός

μαγνητικός συντονισμός, που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου αλλά λειτουργούν μέσω μιας επαγωγικής διαδικασίας αποκλείοντας εναλλακτικές λύσεις, κάτι το οποίο διαφέρει ριζικά από τις εικόνες που παράγονται από την ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. [84]

➤ Κρύσταλλοι

Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες πολλές μεγαλομοριακές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, σταθεροποιούνται για να σχηματίσουν κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Κατά την είσοδο από τη διαλυτή στην κρυσταλλική κατάσταση, μεμονωμένα μόρια της ουσίας υιοθετούν μια ή περισσότερες ίδιες κατευθύνσεις. Ο κρύσταλλος που προκύπτει είναι μια επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη συστοιχία μορίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. [85] Στην εικόνα 22 απεικονίζεται μια τέτοια συστοιχία μορίων. Οι γραμμές στην εικόνα διαιρούν τον κρύσταλλο σε πανομοιότυπες μοναδιαίες κυψελίδες. Με τον όρο μοναδιαία (ή στοιχειώδη) κυψελίδα εννοούμε τη βασική και απλούστερη μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο. Η συστοιχία των σημείων στις γωνίες ή στις κορυφές των μοναδιαίων κυψελίδων ονομάζεται πλέγμα. Εάν γνωρίζουμε το ακριβές περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας μπορούμε να φανταστούμε ολόκληρο τον κρύσταλλο σαν μια πακεταρισμένη συστάδα πολλών μοναδιαίων κυψελίδων που στοιβάζονται η μία δίπλα και πάνω από την άλλη.

Η τοποθεσία ενός ατόμου δίνεται συνήθως από ένα σύνολο τρισδιάστατων καρτεσιανών συντεταγμένων x , y και z . Μία από τις κορυφές χρησιμοποιείται ως η αρχή του συστήματος των συντεταγμένων των στοιχειωδών κυψελίδων και της ανατίθενται οι συντεταγμένες $x = 0$, $y = 0$ και $z = 0$, που συνήθως αναγράφονται $(0,0,0)$.



ΕΙΚΟΝΑ 22: A. Έξι μοναδιαίες κυψελίδες σε κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιέχει δύο μόρια αλανίνης (τα άτομα του υδρογόνου δεν φαίνονται) σε διαφορετικές διαμορφώσεις. B. Η θέση ενός ατόμου στη μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να ταυτοποιηθεί από ένα σύνολο συντεταγμένων στο χώρο. [86]

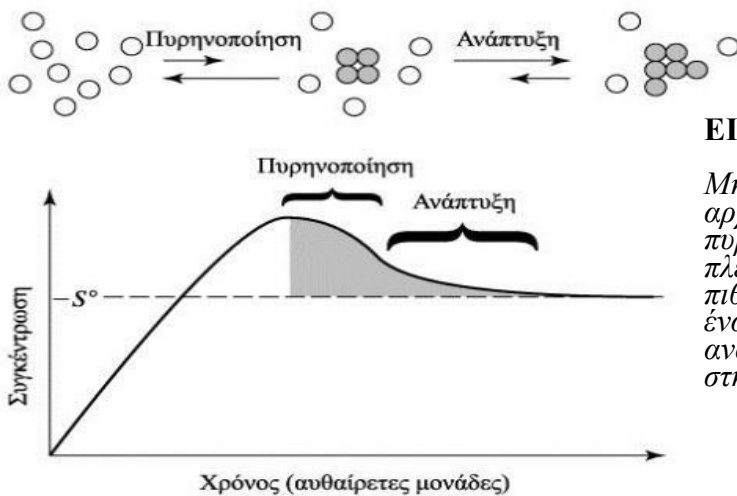
➤ Ανάπτυξη κρυστάλλων

Οι κρυσταλλογράφοι αναπτύσσουν κρυστάλλους πρωτεϊνών με ελεγχόμενη βραδεία κατακρήμιση από υδατικό διάλυμα κάτω από συνθήκες που δεν προκαλείται μετουσίωση της πρωτεΐνης. Υπάρχουν ουσίες που έχουν τη δυνατότητα να επιφέρουν κατακρήμιση πρωτεϊνών. Ιοντικές ενώσεις, όπως είναι τα άλατα, οδηγούν στην κατακρήμιση πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται "εξαλάτωση". Οι οργανικοί διαλύτες προκαλούν επίσης κατακρήμιση πρωτεϊνών, αλλά συχνά αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αφυδατώνουν. Το υδατοδιαλυτό πολυμερές *polyethyleneglycol* (PEG) χρησιμοποιείται ευρέως επειδή αποτελεί ταυτόχρονα ισχυρό κατακρημιστικό και ασθενές μετουσιωτικό. Ένας απλός τρόπος για να επιτευχθεί βραδεία κατακρήμιση είναι να γίνει προσθήκη ενός μετουσιωτή σε ένα υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης μέχρις ότου η συγκέντρωση του μετουσιωτή να είναι ακριβώς παρακάτω από εκείνη που απαιτείται για την καθίζηση της πρωτεΐνης. Τότε, το νερό αφήνεται να εξατμιστεί βραδέως, κάτι το οποίο αυξάνει ελαφρώς τη συγκέντρωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του μετουσιωτή έως ότου συμβεί η κατακρήμιση. Η πιθανότητα η πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο ή αντιθέτως ένα περιττό άμορφο στερεό, εξαρτάται από πολλές ιδιότητες του διαλύματος και από πολλούς παράγοντες 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. [87] Επίσης, το προς κρυστάλλωση δείγμα θα πρέπει να έχει περισσότερη από 95% βιοχημική καθαρότητα για να παράγει έναν κρύσταλλο. Βιοχημικά καθαρό ονομάζεται ένα δείγμα όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Επιπλέον, το δείγμα θα πρέπει να είναι και δομικά καθαρό και κατά συνέπεια τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου. Η δομική καθαρότητα αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο βήματα:

- Ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρηνοποίηση δηλαδή για τον σχηματισμό εναρκτήριων μοριακών συμπλεγμάτων από τα οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι, αποτελεί το σημαντικότερο βήμα. Η πυρηνοποίηση απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη αυτή οδηγός δύναμη προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα διότι εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, τότε ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα

εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Επομένως, πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X.

- Ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου. Όταν μια ουσία είναι κρυσταλλική συνήθως είναι καθαρή γιατί κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης της τα συστατικά που δεν κρυσταλλώνονται παραμένουν στο διάλυμα. Όταν κρύσταλλοι μεγάλης ποικιλίας έρχονται σε επαφή με το μητρικό τους υγρό για αρκετό χρόνο, τότε οι μεγάλοι κρύσταλλοι μεγαλώνουν ακόμα περισσότερο, εις βάρος των μικρών που εξαφανίζονται. [88]

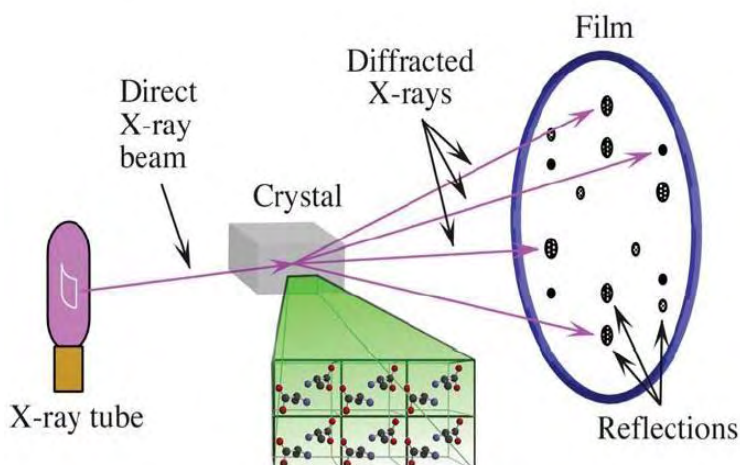


ΕΙΚΟΝΑ 23:

Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός πυρήνων 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.

➤ Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων - Περίθλαση ακτίνων X

Η συνηθέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των χημικών και φαρμακευτικών κρυσταλλικών δομών, καθώς και των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μορίων είναι η περίθλαση των ακτίνων X. Οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στα κρυσταλλικά σώματα είναι της ίδιας τάξης μεγέθους (από 0.1 μέχρι 25 Å) με τα μήκη κύματος των ακτίνων X. Έτσι, οι κρύσταλλοι δρουν σαν φράγματα περίθλασης για τις ακτίνες X. Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής των δομών που προαναφέρθηκαν γίνεται από τα διαγράμματα περίθλασης. Κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων ένας κρύσταλλος τοποθετείται μεταξύ μιας πηγής ακτίνων X και ενός ανιχνευτή ακτίνων X (εικόνα 24). Ο κρύσταλλος ακτινοβολείται από μια στενή ακτίνα ακτίνων X, η οποία προέρχεται από την πηγή. Η απλούστερη πηγή είναι ένας σωλήνας ακτίνων X και ο απλούστερος ανιχνευτής είναι ένα φωτογραφικό φιλμ, στο οποίο θα εμφανιστούν σκούρες κηλίδες όπου προσπέσουν οι ακτίνες X. Αυτά τα σημεία ονομάζονται ανακλάσεις επειδή προκύπτουν από τον κρύσταλλο να ανακλώνται από την επιφάνεια των



ΕΙΚΟΝΑ 24:

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

Οι **χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας** αποτελούν τα αρχικά αποτελέσματα από ένα πείραμα κρυσταλλογραφίας, όπου οι συντεταγμένες των ατόμων του μορίου που μελετήθηκε είναι μία μόνο ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο βασικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας μπορεί να υπολογιστεί με μετασχηματισμό Fourier από το εύρος των παρατηρούμενων (πειραματικών) εντάσεων των ανακλάσεων F_{obs} και από τις φάσεις. Οι φάσεις, φ_{calc} , δεν παρέχονται από πειραματικά δεδομένα και υπολογίζονται από το συγκεκριμένο μοντέλο. Στην πράξη είναι σύνηθες να χρησιμοποιείται ο χάρτης ($2F_{obs}-F_{calc}$, φ_{calc}), που αντιστοιχεί σε μια υπέρθεση δυο τύπων ηλεκτρονιακών χαρτών του (F_{obs} , φ_{calc}) και του ($F_{obs}-F_{calc}$, φ_{calc}), ώστε να παρατηρήσουμε την ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς και τις βελτιώσεις που είναι απαραίτητες να κάνουμε στο ενσωματωμένο μοντέλο, ώστε να ταιριάζει καλύτερα στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Επειδή όλα τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας περιέχουν σε κάποιο βαθμό σφάλματα, είναι αναμενόμενο ότι οι χάρτες που θα προκύψουν θα έχουν σε κάποιο βαθμό θόρυβο. Συνήθως, ένα καλό περίγραμμα απεικόνισης για χάρτη ($2F_{obs}-F_{calc}$, φ_{calc}), είναι το ~ 1 rmsd (*Root-mean-square deviation of atomic positions*). [90] Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Έτσι, μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής (**βελτιστοποίηση μοντέλου**), ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτήν τη διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Πίνακες αντιδραστηρίων και οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την
πειραματική διαδικασία:

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Εταιρεία</i>
1,4-Dithiothreitol, DTT	Applichem
2-mercaptoethanol	Sigma
Acetic acid, CH ₃ COOH	Sds
Acrylamide	Serva
Adenosine Monophosphate, AMP	Sigma
AdenosineTriphosphate, ATP	Sigma
Ammonium persulfate, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Serva
Ammonium sulfate, (NH ₄) ₂ SO ₄	Chemlab
Ampicillin	Serva
Bis-acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay, 5×	Bio-rad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂)	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	Fluka
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Panreac
Dodecylsulfate Na salt, SDS	SERVA
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole	Sigma
Inosine Monophosphate, IMP	Sigma
IPTG	Serva
KH ₂ PO ₄ (potassium dihydrogen phosphate)	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB Agar	Serva
LB Broth (Miller)	Applichem
Magnesium Acetate, (CH ₃ COO) ₂ Mg	Applichem
Ammonium Molybdate tetrahydrate	AppliChem
NaCl	Scharleu
NaOH	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Applichem
Potassium bicarbonate (KHCO ₃)	AppliChem
Potassium chloride, KCl	Alpha Aesar
Sodium acetate, CH ₃ COONa	Merck
Sodium Carbonate Anhydrous, Na ₂ CO ₃	Sds
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Invitrogen
Tris	Applichem
Zinc acetate dehydrate	Sigma
α-D-Glucose 1-Phosphate	Sigma
β-Glycerol phosphate	Sigma

Όργανα

- Πεχάμετρο, *Metrohm*
- Αναλυτικός ζυγός, *Kern*
- Πιπέτες, *LabMate, eppendorf*
- *Sonicationbath*
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο, *WiseBath, Wisd*
- Κλίβανος
- Επωαστήρας
- *Sonicator*
- *FPLC, ÄKTA purifier*
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, *Biorad*
- Χρονόμετρο
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας (*Stirrer*), *Thermolyne*
- Αναδευτήρας τύπου *Vortex*, *MS2minishaker IKA®*
- Φασματοφωτόμετρο *UV-Vis, VWR*
- Αντλία κενού

1. Παρασκευή φωσφορυλάσης b από μυϊκό ιστό κουνελιών

➤ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου έγινε από τους σκελετικούς μύες αρσενικών κονίκλων (*rmGPb*, *Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b*) με τροποποίηση της μεθόδου των *Fisher* και *Krebs*, όπου αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοαιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

Τα βήματα της απομόνωσης της rmGPb είναι τα εξής:

Ημέρα 1^η

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος

Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια, καθώς και από τους ραχιαίους μύες κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3 κονίκλους και τοποθετείται αμέσως σε πάγο.

1. Ο μυϊκός ιστός ομογενοποιείται σε παγωμένη κρεατομηχανή, ζυγίζεται και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού.
2. Το ομογενοποίημα εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ **3 φορές** σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Προσέχουμε ο συνολικός χρόνος εκχύλισης να μην ξεπεράσει τα **30 λεπτά**. Η τελευταία εκχύλιση γίνεται με χρήση μισού όγκου απιονισμένου ύδατος.

Η διαδικασία είναι η εξής:

- a) Ομογενοποίημα + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί **8 λεπτά**
 - b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
 - c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ
3. Το εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

4. Ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2 με προσθήκη 1 N CH_3COOH υπό ελαφρά ανάδευση (το εκχύλισμα δεν χρειάζεται να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών.
5. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 λεπτά.
6. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 gcf επί 30 λεπτά.
7. 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. Όταν ο όγκος του διαλύματος μέσα στην φιάλη γίνει περίπου 1.5 L 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.
8. Ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος $KHCO_3$ (Δείγμα-Διαδρομή 1).

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

9. Απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου 3.6 M = 0.837 X όγκος εκχυλίσματος
10. Ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου 3.6 M 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.
11. Το διάλυμα του θειικού αμμωνίου προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση (4220 ml).
12. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για 24 ώρες.
13. 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα.

Ημέρα 2^η

Τα βήματα είναι τα εξής:

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 λεπτά.
3. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Τα σακουλάκια διαπίδυσης (10.000 *Daltoncut-off*) πλένονται με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος στο οποίο φυλάσσονται.
5. 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 νύχτα.

(Δείγμα-Διαδρομή 2 πριν τη διαπίδυση)

Ημέρα 3^η

Τα βήματα είναι τα εξής:

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 rpm για 15 min (0 – 4 °C).
3. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου υγρού (Δείγμα-Διαδρομή 3).
4. Προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 0.3 M β-μερκαπτοαιθανόλης *pH* 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

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

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

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

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

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 στους 37 °C επί 1 ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα.
8. Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το *pH* 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 λεπτά (25-30 °C).

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b

10. Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση ογκομετρείται (Δείγμα-Διαδρομή 4).
11. Προθήκη διαλύματος *AMP* 0.1 M, *pH* 7.0 στο υπερκείμενο σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος X 1/100} = 1.3 \text{ ml}$$
12. Προσθήκη διαλύματος $(CH_3COO)_2Mg$, *pH* 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } (CH_3COO)_2Mg, \text{ pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος X 1/100} = 1,3 \text{ ml}$$
13. Το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά *tubes* φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύχτα για να κρυσταλλωθεί.

Ημέρα 4^η

Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 28.710 *rcf* σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 λεπτά με τη χρήση της μικρής κεφαλής.
2. Η θερμοκρασία της φυγοκέντρου επαναφέρεται στους 25-30 °C
3. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β -Merc/50 mM β -glycerolphosphate/1 mM EDTA) *pH* 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου.
4. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 *rcf* επί 10 λεπτά (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.
5. Το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται
6. Προσθήκη διαλύματος *AMP* 0.1 M, *pH* 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

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

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

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

8. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά σωληνάρια φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες.

(1^η ανακρυστάλλωση) (Δείγμα-Διαδρομή 5)

(2^η ανακρυστάλλωση)

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

Ημέρα 5^η

Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1^η ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3^η ανακρυστάλλωση.
2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1^η ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς όμως την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.
3. Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β ως ακολούθως:

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

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

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (ϵ) για την rmgPb ισούται με $1.32\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$

Συνεπώς,

$C_{\text{rmGPb}} = 144 \text{ mg/mL} \rightarrow 1,04\text{g}$

4. Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και φυλάσσεται στους -20°C

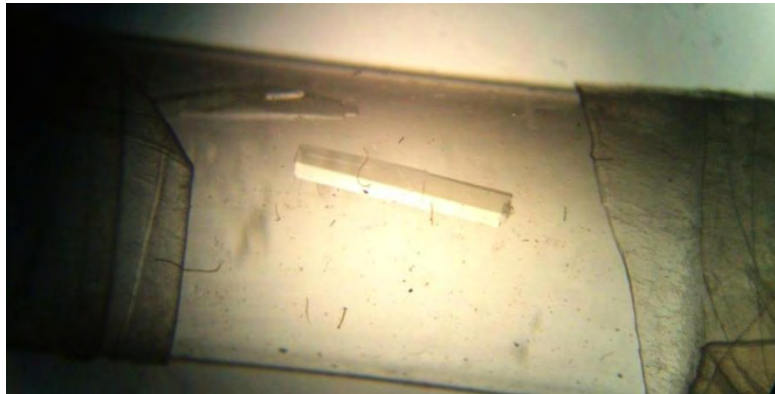
➤ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΤΗΣ GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP, διότι η *rmGP* σε αντίθεση με την *hlGP*, συνδέει το AMP και μετατοπίζεται η ισορροπία προς την ενεργό R στερεοδιαμόρφωση. 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 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετράται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260nm και 280nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι μικρότερος του 0.53.

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι, δίνεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων GPb (T-διαμόρφωση) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο *batch*. [91] 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-διαμόρφωση), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων. Οι κρύσταλλοι της GPb αναπτύσσονται από μίξη 20-30mg/mL καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1mM EDTA και 0.02%(w/v) NaN_3 στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης. [92] Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 ώρες στους 16°C , ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως, το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση

ακτινών-Χ. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



ΕΙΚΟΝΑ 25: Κρύσταλλος της GPb στην T διαμόρφωση.

2. Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής GP (hIGP)

Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PYGL) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης *pET-M11*, σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli BL-21 GOLD (DE3)*. Ο φορέας αυτός προσδίδει στην πρωτεΐνη μια αλληλουχία 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά τη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης. Όλες οι διαδικασίες χειρισμού των βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επώαστηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο.

Αρχικά, μικρή ποσότητα κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth* των 10 mL, στο οποίο προστέθηκαν 20 $\mu\text{g/mL}$ καναμυκίνης, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο (MnCl_2) και 10 mg/L πυριδοξίνη. Το υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth (Lysogeny broth)* παρασκευάστηκε κατά Miller και περιείχε 10 g *NaCl*, 10 g τρυπτόνη και 5 g εκχύλισμα ζύμης (*yeast extract*) για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου, καθώς ρυθμίστηκε και το *pH* του θρεπτικού μέσου στο 7 με λίγες σταγόνες *NaOH*. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες των 10 mL αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στους 37 °C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια, 10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένη φιάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth*, όγκου 1 L (αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε επίσης 20 $\mu\text{g/mL}$ καναμυκίνη, 600 mg/L MnCl_2 και 100 mg/L πυριδοξίνη. Από το παραπάνω θρεπτικό-μίγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύναμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα, για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φασματοφωτομετρίας ($\lambda=600 \text{ nm}$). Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε ανακινούμενο επωαστήριο 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 φιάσκες με τις υγρές καλλιέργειες

τοποθετηθήκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, *IPTG*, σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM στην υγρή καλλιέργεια. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχώμενο ανακινούμενο επωαστήρα στους 18 °C, 210 rpm για 12 έως 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες τοποθετηθήκαν σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση και τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (250 mL) σε 5000 rpm, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχτηκε το ίζημα. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM β-GP (pH 7), 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole και 1 mM PMSF. Το PMSF προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 20 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων εφαρμόζοντας υπερήχους σε πάγο: 30 sec εφαρμογή υπερήχων/30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 1 ώρα, 4 °C, σε 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm και αφήσαμε το κυτταρόλυμα στον πάγο. Η απομόνωση της *hlGP* έγινε σε τρία βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε κατά τον καθαρισμό με το σύστημα ÄKTA-FPLC ήταν φιλτραρισμένα με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.45 μm και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

➤ Στήλες χρωματογραφίας

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση και τον καθαρισμό της *hlGP* είναι με τη σειρά:

Πρώτοβήμα: IMAC με ακινητοποιημένα ιόντα Co^{+2} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (1stHis-Trap, GE Healthcare).

Το πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της *hlGPb* βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εξαιτίας της ετικέτας των ιστιδινών που διαθέτει, εμφανίζει συγγένεια με τα Co^{2+} τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια σεφαρόζης στη στήλη. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα β-GP 20mM, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole (διάλυμα *bufferA*) 250ml, pH=7 με ροή 0.5mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχτηκαν κλάσματα των 10 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A με ροή 0.5 mL/min και συλλέχτηκαν 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, 500 mM imidazole (διάλυμα *bufferB*) 200ml, pH=7 και συλλέχτηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των

κλασμάτων με *SDS-PAGE* και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο *Bradford*. Έπειτα, το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος *20 mM Tris, 1 mM DTT (Dialysisbuffer* ή διάλυμα A της *Resource Q*) *pH=8*, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4°C για 16 ώρες, για να απομακρυνθεί το *NaCl*.

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

Το δεύτερο στάδιο απομόνωσης και καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η *hlGP* προσδένεται στη στήλη *ResourceQ* λόγω του αρνητικού φορτίου της σε *pH 8.0*. Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο *pH 8* η *hlGPb* έχει αρνητικό φορτίο και έτσι μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως η στήλη *Resource Q*. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα *20 mM Tris, 1 mM DTT* (διάλυμα A *Resource Q*) *pH=8*, 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, 1 M NaCl, 1 mM DTT* (διάλυμα B), *pH=8, 200ml* και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου *1 mL*. Πιο συγκεκριμένα, η έκλουση έγινε για 40 λεπτά, 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 προσδεδεμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με *SDS-PAGE* και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών και προστέθηκε πρωτεάση *TEV* σε αναλογία *1 mg TEV* για *40 mg* ολικής πρωτεΐνης. Μετά την προσθήκη της πρωτεάσης *TEV* το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση(για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου) έναντι διαλύματος *20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole (Dialysis buffer* ή διάλυμα A της *His-Trap* αφαιρετικής) *pH=8*, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4°C για 16 ώρες.

Τρίτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (2^η His-Trap αφαιρετική, GE Healthcare)

Το τρίτο στάδιο της απομόνωσης και καθαρισμού της *hlGPb* 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 από 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 *hlGPb*.

Αρχικά, έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά τη διαπίδυση. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole (διάλυμα buffer A) pH=8, 200 ml, 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, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole (διάλυμα B) pH=8, 150 mL και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και η πρωτεΐνη όπως αναμενόταν βρισκόταν στο *flowthrough*, καθώς δεν διαθέτει την *His-Tag* που της επιτρέπει να δεθεί στη στήλη, καθώς αυτή η ετικέτα απομακρύνθηκε με τη δράση της πρωτεάσης TEV.

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω βημάτων, την ολοκλήρωση δηλαδή της χρωματογραφίας των τριών στηλών, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά που περιείχαν την *hlGPb* σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι *cutoff* 30.000 Daltons. Κάναμε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 4000g, ώστε πάνω από το φίλτρο να μείνουν περίπου 100 μ L πρωτεΐνης. Τέλος, προσδιορίσαμε την ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford, όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή. Έτσι, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της *hlGP*: 2,2 mg/ml. Η συγκέντρωση αυτή ταυτοποιήθηκε και με φωτομετρικό προσδιορισμό με UV ακτινοβολία, ο οποίος έδειξε την ίδια συγκέντρωση ενζύμου.

$$C_{hlGPb} = 2.2 \text{ mg/ml}$$

Στη διάλυμα του ενζύμου (2,2 mg/ml) προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (50% γλυκερόλη) και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους -20 °C. Έτσι, η **τελική συγκέντρωση** της *hlGP* με την οποία σχεδιάστηκε και το πειραματικό πρωτόκολλο για τα κινητικά, ήταν 1,1 mg/mL.

3. Φωσφορυλίωση της *hlGP*

Η φωσφορυλίωση της *hlGPb* γίνεται, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, από την *PhK* και συγκεκριμένα από την γ -καταλυτική της υπομονάδα στη *Ser14* της *hlGPb*. Η φωσφορυλίωση της *hlGPb* που απομονώθηκε έγινε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 1X *Hepes buffer* (pH 8.2), 1 mM ATP, 16 ng/mL *rmPhK- γ -trunc*, 0.33mg/mL *hlGPb*. Η *rm PhK- γ -trunc* αραιώθηκε αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X *Hepes buffer* και 5 mg/mL BSA και στη συνέχεια προστέθηκε στην αντίδραση. Επομένως το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη φωσφορυλίωση περιέχει επιπλέον BSA. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε

υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 90 λεπτά στο σκοτάδι και έπειτα ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο και κατάλληλου όγκου διαλύματος TEA, pH 6.8.

Όγκος φωσφορυλίωσης 50μL:

- **0.33 mg/ml hIGPb**
- **1x Hepes buffer**
- **1 mM ATP**
- **16 ng/ml rmPhk-γ-trunc**

4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

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

Γίνεται παρασκευή των διαλυμάτων:

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

Αφού ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα και έγινε η ρύθμιση του pH, αναμίξαμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Αφήσαμε το μίγμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος, διότι είναι φωτοευαίσθητο, ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια, προσθέσαμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 λεπτά σε υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}), το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. [93] Για να

μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, πρέπει να παρασκευάσουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα.

5. Ενζυμικό διάλυμα

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση $5 \mu\text{g/mL}$ *hIGPa* σε όγκο $3.300 \mu\text{L}$ ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν $180 \mu\text{L}$, να είχαμε $1 \mu\text{g/mL}$ *hIGPa* σε 0.2% γλυκογόνο. Δηλαδή, στον αρχικό όγκο φωσφορυλίωσης $50 \mu\text{L}$ αραίωσαμε με $1.600 \mu\text{L}$ *TEA Buffer* σε τελικό όγκο $1.650 \mu\text{L}$. Σε αυτόν τον όγκο προστέθηκε ίσος όγκος γλυκογόνου 2% δηλαδή $1.650 \mu\text{L}$, και έτσι πήραμε τελικά $3.300 \mu\text{L}$ ενζυμικού διαλύματος που περιείχε τελικά, *hIGPa* $5 \mu\text{g/mL}$ και 1% γλυκογόνο.

<u>Αρχικές συγκεντρώσεις σε όγκο 1.650 μL</u>	<u>Τελικές συγκεντρώσεις σε όγκο 3.300 μL</u>
hIGPa 10 $\mu\text{g/mL}$	hIGPa 5 $\mu\text{g/mL}$
γλυκογόνο 2% (w/v)	γλυκογόνο 1% (w/v)

Το ενζυμικό διάλυμα είναι αυτό που αποτελείται από τις τελικές συγκεντρώσεις. Προτού ξεκινήσουμε τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων αφήσαμε το ενζυμικό διάλυμα για $15'$ στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C , ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

6. Υποστρώματα

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε, μελετήσαμε ουσιαστικά την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή της προσθήκη της *GIP* στο μακρομόριο του γλυκογόνου. Επομένως, το υπόστρωμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η $\alpha\text{-D-1-}$ φωσφορική γλυκόζη.

Οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος που μελετήσαμε βρίσκονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 2 (*Assay Buffer 2*) που περιέχει 270 mM KCl , 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM DTT , 2.7 mM EDTA , το οποίο παρασκευάσαμε με αραίωση από ένα πιο πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 1 (*Assay Buffer 1*) που περιέχει 400 mM KCl , 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT , 4 mM EDTA και $\text{pH}=6.8$. Αρχικά, παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα *GIP* με συγκέντρωση 400 mM στο οποίο ρυθμίσαμε το pH στο 6.8 και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία -20°C , αφού

πρώτα το διαμοιράσαμε σε κλάσματα των 500 μ L. Από τα 400 mM παρασκευάσαμε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

<u>Αρχικές συγκεντρώσεις</u>	<u>Τελικές συγκεντρώσεις</u>
G1P 400 mM	G1P 90 mM
AssayBuffer 1	AssayBuffer 2

Οι υπόλοιπες αραιώσεις της *GIP* που χρησιμοποιήσαμε παρασκευάστηκαν με αρραίωση από την *GIP* 90mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2 (*Assay Buffer* 2).

<u>Stock G1P</u>	<u>Στην αντίδραση:</u>
4.5 mM	1 mM
9 mM	2 mM
13.5 mM	3 mM
18 mM	4 mM
27 mM	6 mM

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

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ hIGPa:

✓ Για την $K_M(\text{control})$:

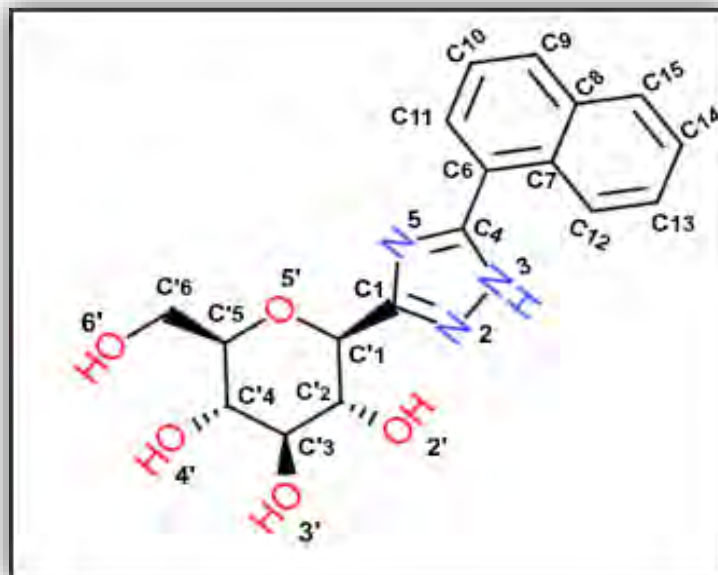
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	A	B	Γ	Δ	E
G1P (από τα παραπάνω stock)	40 μl (4.5mM)	40 μl (9mM)	40 μl (13.5mM)	40 μl (18mM)	40 μl (27mM)
dH ₂ O μl	96,8 μl	96,8 μl	96,8 μl	96,8 μl	96,8 μl
50% DMSO (v/v)	7,2 μl	7,2 μl	7,2 μl	7,2 μl	7,2 μl
V _{τελ}	144 μl	144 μl	144 μl	144 μl	144 μl

✓ Για την $K_{M \text{ app}}$:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	A	B	Γ	Δ	E
G1P (από τα παραπάνω stock)	40 μl (4.5mM)	40 μl (9mM)	40 μl (13.5mM)	40 μl (18mM)	40 μl (27mM)
dH ₂ O μl	96.8 μl	96.8 μl	96.8 μl	96.8 μl	96.8 μl
Αναστολέας σε 50% DMSO (v/v)	7.2 μl	7.2 μl	7.2 μl	7.2 μl	7.2 μl
V _{τελ}	144 μl	144 μl	144 μl	144 μl	144 μl

7.Αραιώσεις αναστολέα

Μελετήθηκε ο αναστολέας *Szk158*, η χημική δομή του οποίου φαίνεται στην εικόνα 26.



ΕΙΚΟΝΑ 26: Συντακτικός τύπος της δομής του αναστολέα *Szk158*. Στην εικόνα φαίνεται η αρίθμηση για κάθε άτομο C, O, N, H.

Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε κατάλληλο όγκο *DMSO* ώστε να έχει συγκέντρωση 100 *mM*. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις (της τάξης των μM) μειώσαμε τη συγκέντρωση του *DMSO* σε 50 % (v/v), ώστε στην αντίδραση (180 μL) να έχουμε 2% (v/v) *DMSO*. Η K_M του ενζύμου στην περίπτωση αυτή προσδιορίστηκε παρουσία 2 % (v/v) *DMSO* στην αντίδραση των 180 μl . Για τον προσδιορισμό των $K_{M(\text{app})}$ χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, όπως και στον προσδιορισμό της K_M , αλλά κάθε φορά το πείραμα έγινε παρουσία μίας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα. Ο προσδιορισμός της K_i έγινε με 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα:

- **1^η $K_{M(\text{app})}$:** Για να έχω **5 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 125 μM .
- **2^η $K_{M(\text{app})}$:** Για να έχω **7.5 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 187.5 μM .
- **3^η $K_{M(\text{app})}$:** Για να έχω **10 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 250 μM .
- **4^η $K_{M(\text{app})}$:** Για να έχω **12 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 300 μM .

- **5^η $K_{M(app)}$:** Για να έχω **15 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 375 μM .
- **6^η $K_{M(app)}$:** Για να έχω **20 μM αναστολέα** στην αντίδραση 180 μL πήραμε 7.2 μL από *stock* αναστολέα 500 μM .

8. Πειραματική πορεία προσδιορισμού πειραματικών παραμέτρων

- Για τον προσδιορισμό της **K_M (control)** λάβαμε 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα, το οποίο αφήσαμε προηγουμένως στο υδατόλουτρο να επωαστεί για 15 λεπτά, και προσθέσαμε στα 144 μL του πρώτου διαλύματος υποστρώματος (A). Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης ίσο με 180 μL . Οι συγκεντρώσεις της *GIP* ήταν 1, 2, 3, 4, 6 mM όπως αναφέραμε παραπάνω. Στη συνέχεια, πήραμε 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5 λεπτά (δηλαδή σε χρόνους 5, 10, 15, 20 min) και τα αποθέσαμε σε 10 μL *SDS* 1% για να σταματήσει η αντίδραση, καθώς αποδιατάσσει το ένζυμο. Κατόπιν, κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.
- Για τον προσδιορισμό των **$K_M(app)$** το παραπάνω πείραμα έγινε παρουσία μιας σταθερής και διαφορετικής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά. Στη συνέχεια, παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση. Έτσι, παρασκευάσαμε τα παρακάτω διαλύματα εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10 μL *SDS* 1% (w/v):

Περιεκτικότητα τυφλών διαλυμάτων:

Τυφλό H_2O	40 μl dH ₂ O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	32 μL dH ₂ O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό <i>GIP</i>	31.1 μL dH ₂ O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση <i>GIP</i> (27 mM)
Τυφλό φωσφορικών	30 μL dH ₂ O + 10 μL <i>Pi</i> 1 mM

Επομένως, σε 40 μL των τυφλών είχαμε 1 $\mu g/mL$ *hIGPa*, 6 mM *GIP* και 0.25 mM *Pi*. Από την απορρόφηση που πήραμε για τα 6 mM *GIP*, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά τα 15 λεπτά επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα αλλά και στα τυφλά, 500 μL διαλύματος φωτομέτρησης. Στη συνέχεια, κάναμε ανάδευση και τα τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 λεπτά, ώστε να δημιουργηθεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Τέλος, μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε

μήκος κύματος 850 nm, αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του dH_2O . Παρ' ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής σε όξινο pH, στο pH 5.0 είναι αρκετά σταθερή. Οπότε, αυτή η φασματοφωτομετρική μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φωσφόρου που παράγεται κατά την αντίδραση της GP που μελετήσαμε. [94]

9. Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit*. [95] Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (K_M , V_{max} , K_i) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μmol υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή $\mu mol/min/mg$.

Για να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα από τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τα μmol φωσφορικών που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών όπως αναφέραμε παραπάνω. Τα 0.25 mM φωσφορικών αντιστοιχούσαν σε 0.01 μmol φωσφορικών.

Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των φωσφορικών είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μmol φωσφορικών. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των φωσφορικών σε μmol για κάθε δείγμα. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μmol φωσφορικών που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την GIP. Έτσι, η απορρόφηση των φωσφορικών ισούταν με:

$$(B - \text{Abstυφλού ενζυμικού διαλύματος} - \text{Abstυφλού GIP}) = \text{Absφωσφορικών του δείγματος} = C$$

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

$$(C * 0.01) / A \quad \text{ή} \quad C / A * 100 = \mu mol \text{ φωσφορικών στο άγνωστο δείγμα}$$

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

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

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

- ✓ [G1P]: η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση
- ✓ Assay volume: Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μ L).

Και:

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

C: η συγκέντρωση του ενζύμου hlGPa στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με $C_{\text{ενζ.}} = 0,1 \text{ mg/mL}$.

Άρα συνολικά:

[G1P] final (mM)	hlGPa	
	Limit	f
1	0.0312	780
2	0.0624	1560
3	0.0936	2340
4	0.1248	3120
6	0.1872	4680

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_M) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten ($K_{M(\text{app})}$) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή:

$$v = [S] / K_M + [S]$$

V: ταχύτητα

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

K_M : σταθερά Michaelis-Menten.

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

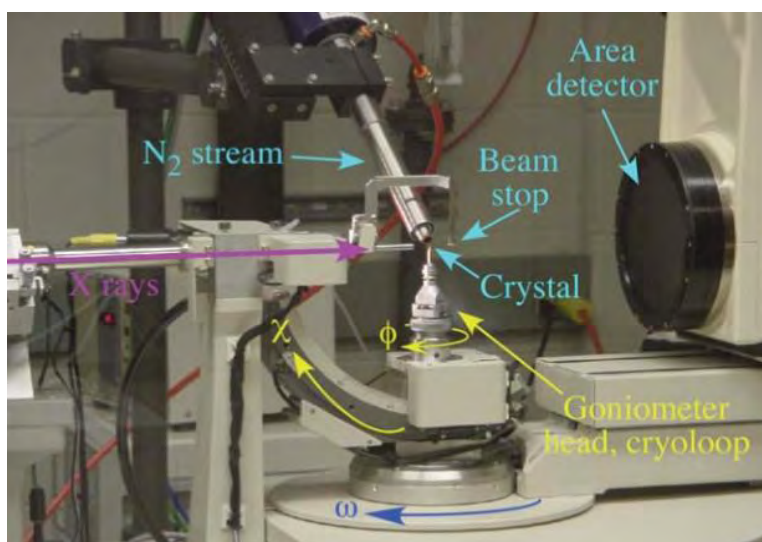
$$y = ax + b$$

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

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

10. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης του υπό μελέτη αναστολέων στην GP. Για την κρυσταλλογραφία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *rmGP* αντί της *hlGP*, καθώς τα δύο αυτά ένζυμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία τους, και οι καταλυτικές τους θέσεις είναι όμοιες τόσο στην αλληλουχία αμινοξέων όσο και στη δομή. Ο κρύσταλλος της *rmGPb* (*T*-στερεοδιαμόρφωση) τοποθετήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που περιείχε 10 mM BES pH 6.7, 10 % (v/v) DMSO και 1 mM SzK158 για 3 ώρες. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το διάλυμα και κλείσαμε το τριχοειδές με κερί αφού προσθέσαμε πρώτα στις άκρες λίγο διάλυμα 10 mM BES. Τέλος, το τριχοειδές τοποθετήθηκε στη κατάλληλη υποδοχή στο γωνιόμετρο ανάμεσα στον ανιχνευτή και την πηγή της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίστηκε ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιόμετρου και η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου. Η έκθεση του μονοκρυσταλλου 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 περιθλάμενης 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 ηλεκτρονική πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.



ΕΙΚΟΝΑ 27: Διάταξη που χρησιμοποιείται για τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων, στην οποία φαίνεται η πηγή ακτίνων X , η θέση του γωνιόμετρου και ο ανιχνευτής. Κάτω: Στην εικόνα φαίνεται ένα περιθλασίμετρο 4 κύκλων. Οι ακτίνες X προέρχονται από τα αριστερά από μία περιστρεφόμενη άνοδο (δε διακρίνεται) και κατευθύνονται για να χτυπήσουν τον κρύσταλλο. Ένας CCD ανιχνευτής ανιχνεύει τις ανακλάσεις. Ο κρύσταλλος εάν το επιθυμούμε μπορεί διατηρείται παγωμένος από ένα ρεύμα ψυχρού αέριου αζώτου. Η περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από τους άξονες ϕ και χ κατευθύνει πολλές ανακλάσεις προς τον ανιχνευτή. Στη διάταξη που παρουσιάζεται, οι άξονες ϕ , 2θ και ω συμπίπτουν. [96]

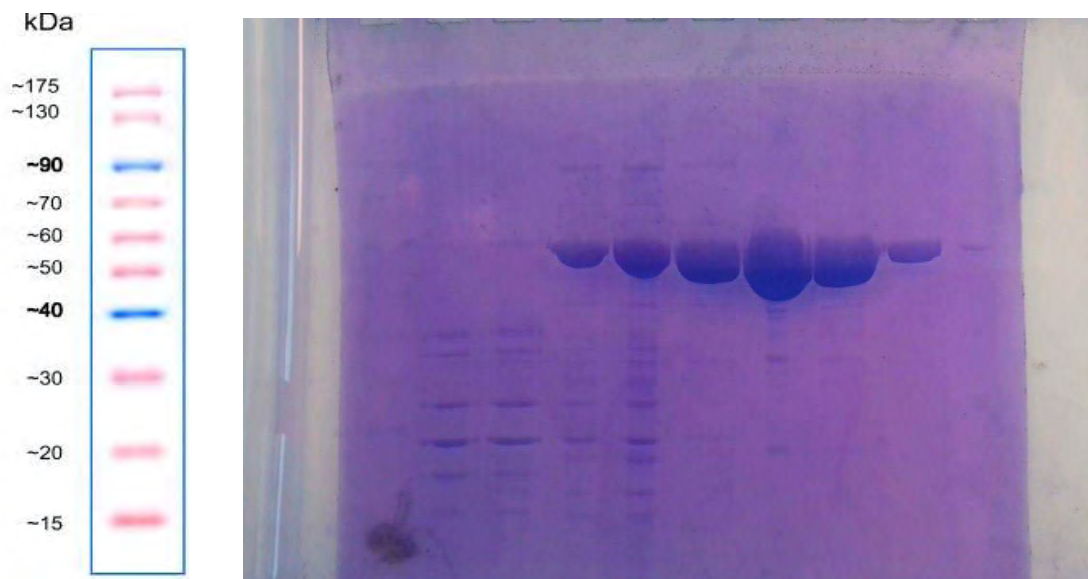
11. Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

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* [97], [98] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων *CCP4*. [99] Οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν ήταν οι ατομικές συντεταγμένες και οι συντελεστές θερμοκρασίας. Το μοντέλο δομήθηκε με το πρόγραμμα *Coot* [100], [101]. Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας $F_{obs}-F_{calc}$ και $2F_{obs}-F_{calc}$, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Το μόριο του αναστολέα συμπεριλήφθηκε επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (*refinement*). Η δομή του συμπλόκου *rmGPb*-αναστολέα 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. [105]

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Απομόνωση και καθαρισμός της rmGP



ΕΙΚΟΝΑ 28:

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

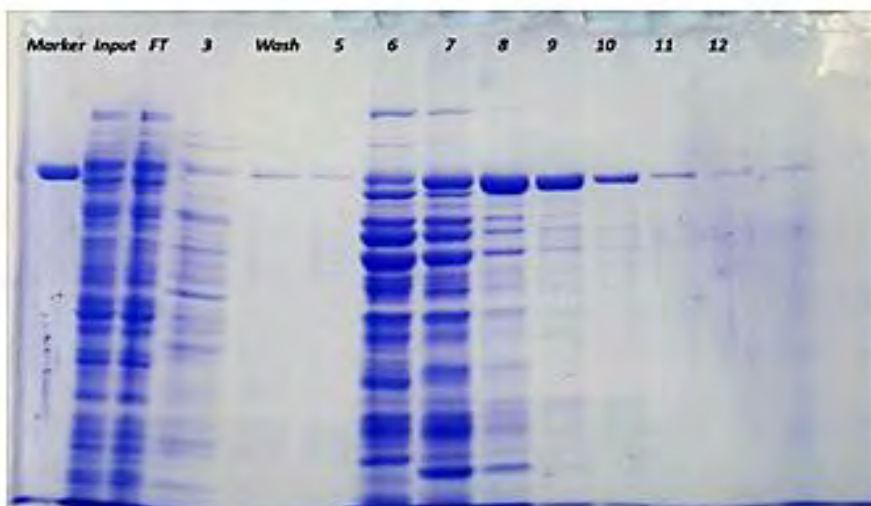
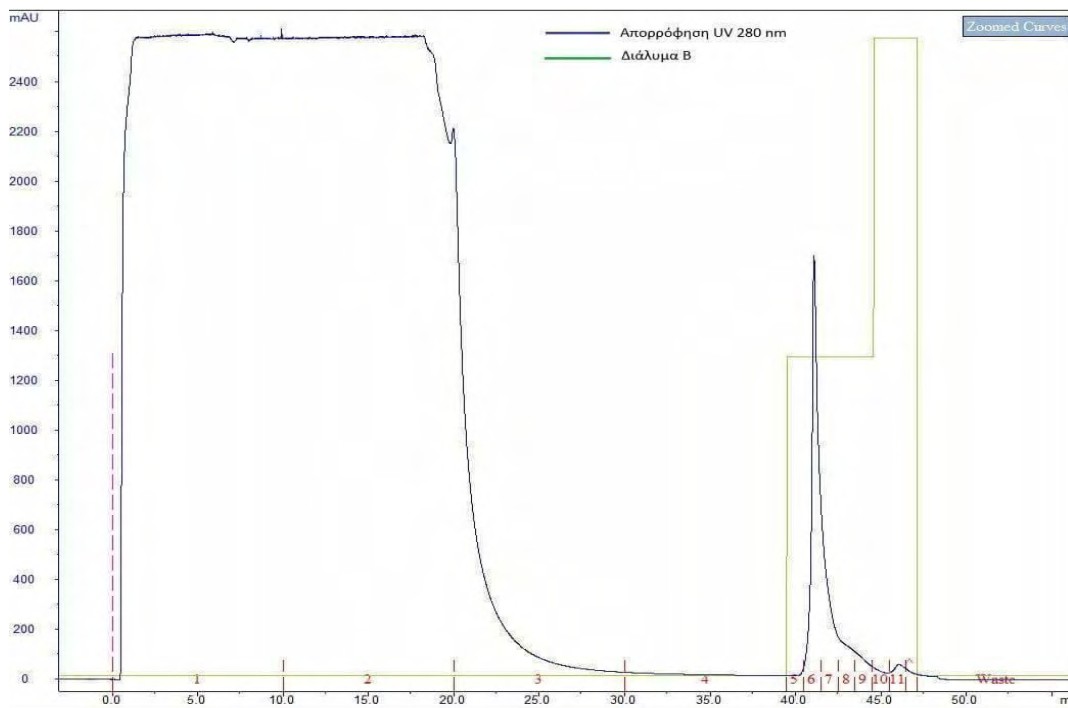
Παρατηρούμε πως η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνεται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η *rmGPb*, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Τέλος, στη διαδρομή 8, φαίνεται πως η καθαρότητα της

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 κονίκλων

2. Απομόνωση και καθαρισμός hIGP

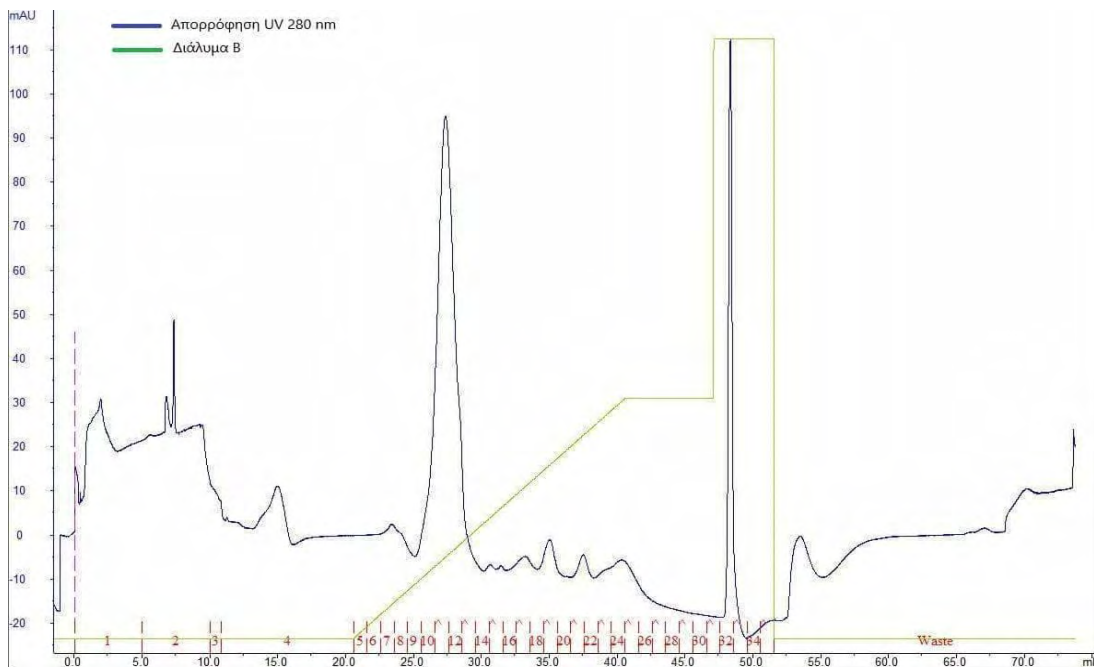
Χρωματογράφημα της 1^{ης} στήλης His - Trap

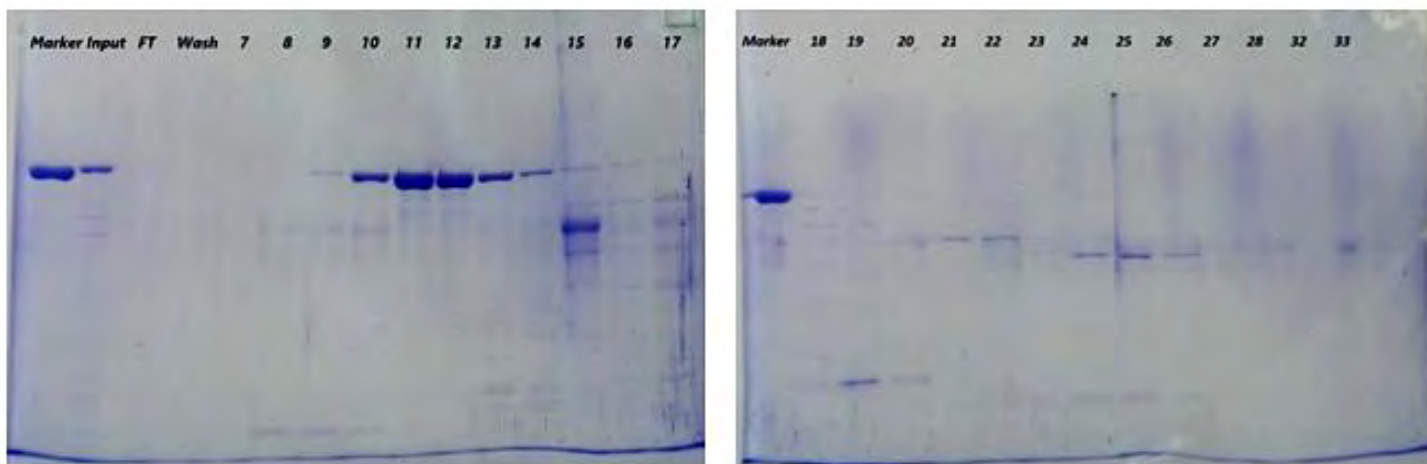


ΕΙΚΟΝΑ 29:

10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Πρώτο βήμα καθαρισμού της hIGP (1st His-Trap, GE Healthcare). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα (πάνω) και τα αποτελέσματα (κάτω) από 10% SDS-PAGE ανάλυση, από τα αριστερά προς τα δεξιά: διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας χρησιμοποιείται η rmGPb που έχει M.B. 97kDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through-FT), διαδρομή 4: κλάσμα 3, διαδρομή 5: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 6-13: έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 5-12)

Χρωματογράφημα της 2^{ης} στήλης Resource Q

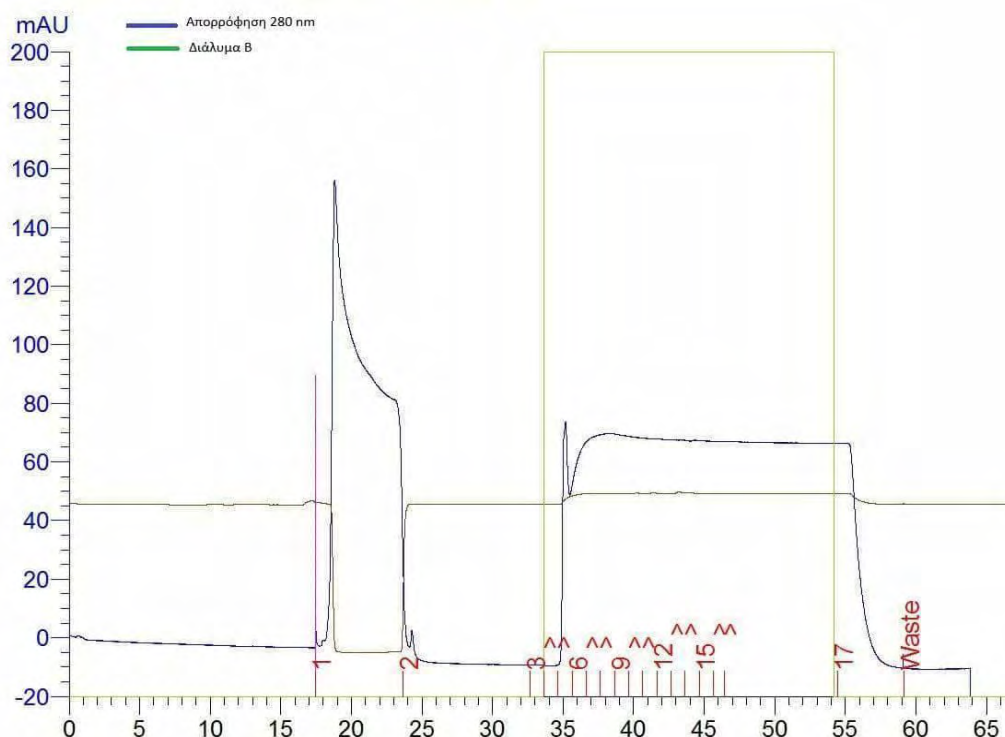


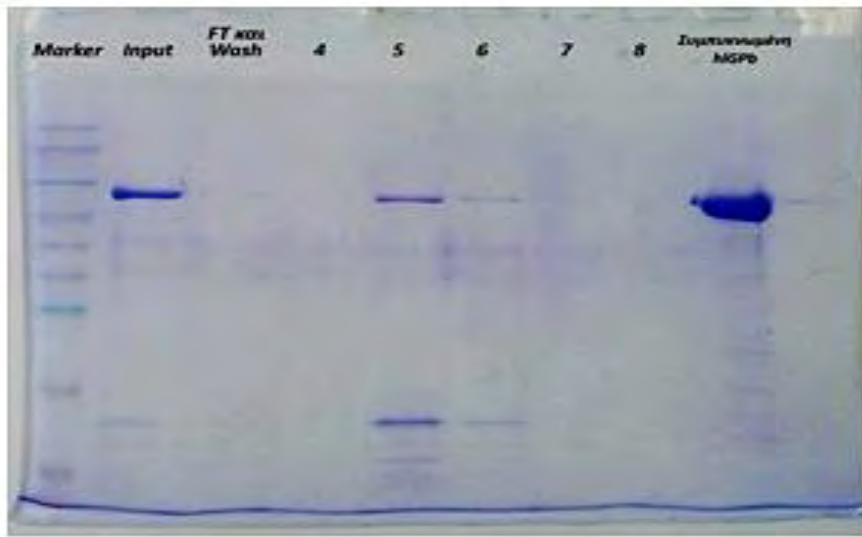


ΕΙΚΟΝΑ 30:

10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Δεύτερο βήμα καθαρισμού της hIGP (2^η Resource Q). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10% SDS-PAGE ανάλυση, από τα αριστερά προς τα δεξιά, διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η rmGPb που έχει απομονωθεί από κονίκλους και έχει M.B. 97kDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 7-17 (1^ο gel) και διαδρομές 18-33 (2^ο gel): έκλυση των 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).

Χρωματογράφημα της 3^{ης} στήλης His-Τραφαϊρετική



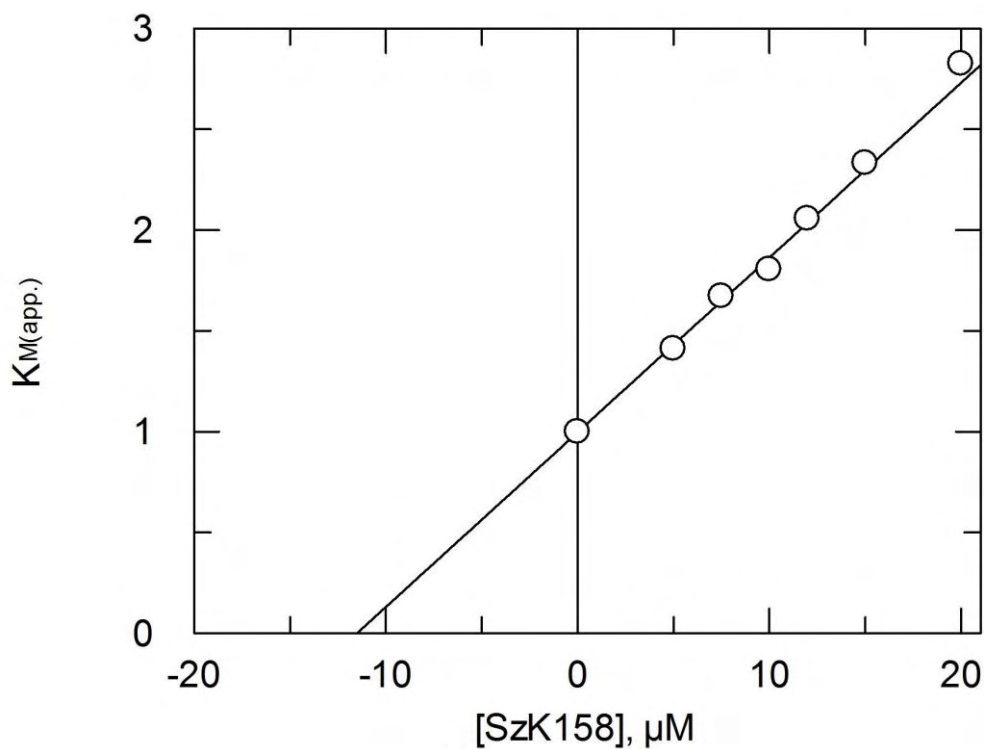


ΕΙΚΟΝΑ 31:

10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της hIGP (97 kDa). Τρίτο βήμα καθαρισμού της hIGP (3^η His-Trap αφαιρετική). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από 10% SDS-PAGE ανάλυση, από τα αριστερά προς τα δεξιά: διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (FlowThrough, κλάσμα 2) και πλύση της στήλης (Wash, κλάσμα 3), διαδρομές 4-8: έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών (κλάσματα 4-8), διαδρομή 9: παρουσιάζεται η hIGPb μετά τη συμπύκνωσή της

3. Κινητικές μελέτες

Προσδιορισμός της **K_i** του αναστολέα **Szk158**:



Η K_i προσδιορίσθηκε: $K_i = 11.5 \pm 0.22$

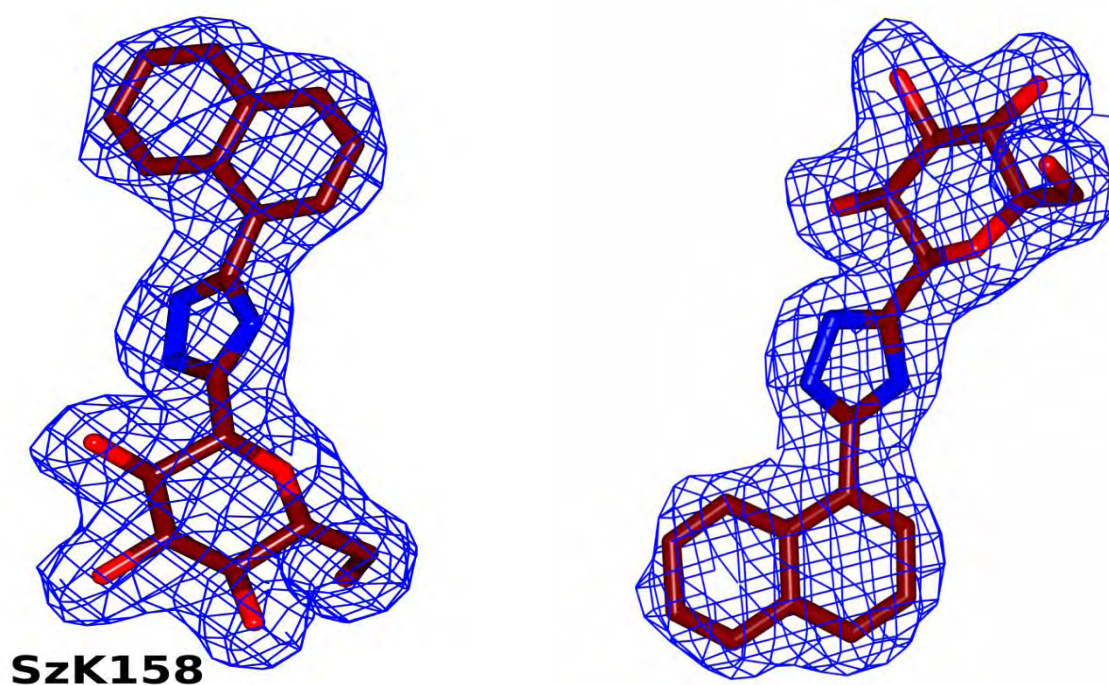
4. Δομικές μελέτες

Στον Πίνακα 4 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που σχηματίζει ο αναστολέας με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο της *rmGPb*. Τα μόρια ύδατος δημιουργούν ένα έμμεσο δίκτυο σύνδεσης των μορίων των αναστολέων με γειτονικά αμινοξέα του κέντρου σχηματίζοντας γέφυρες ύδατος (*water bridges*).

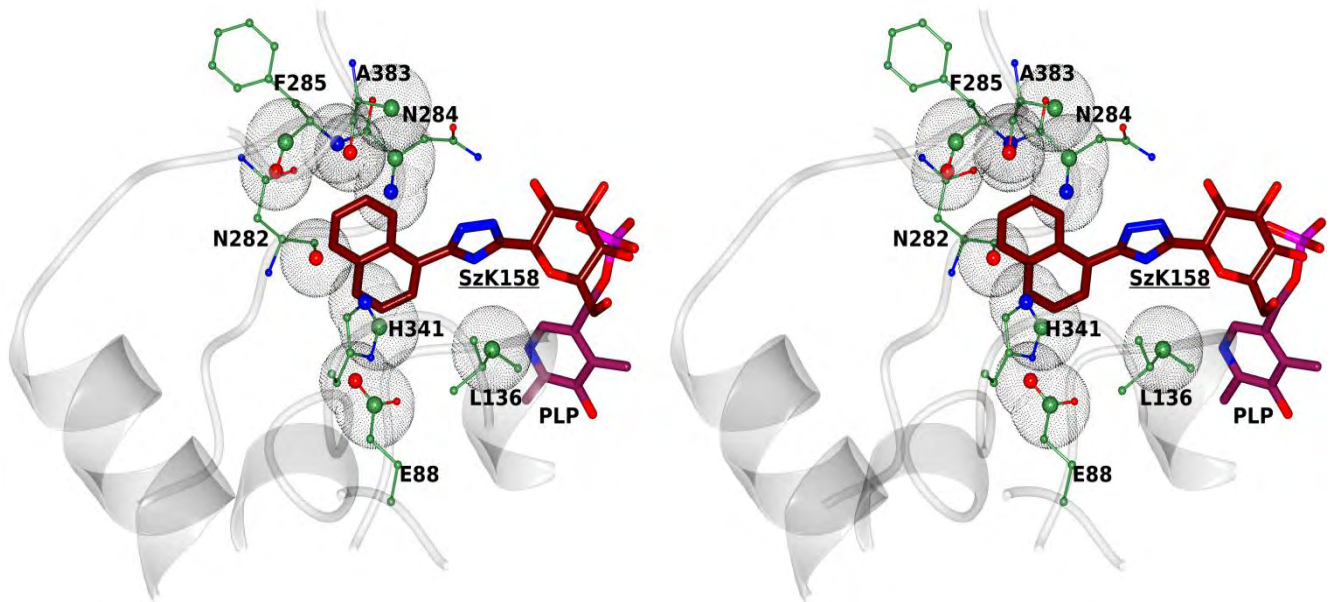
Πίνακας 4: Αλληλεπιδράσεις των ατόμων του αναστολέα με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στον πίνακα παρουσιάζονται και οι αποστάσεις που σχηματίζονται σε Å.

Ατομο αναστολέα	Αμινοξέα (άτομα)	
	Δεσμοί υδρογόνου (Å)	Αλληλεπιδράσεις van der Waals
C1'		Water338(O), Water311(O)
C2'		Glu672(OE1), Asn284(ND2), His377(O), Water321(O), Water338(O)
O2'	Tyr573(OH):3.1, Glu672(OE1):3.3, Asn284(ND2):2.6, Water338(O):2.8, Water321(O):2.8	Asn284(CG)
C3'		Gly675(N), Glu672(OE1), Water133(O), Water338(O)
O3'	Ser674(N):3.1, Gly675(N):3.3, Glu672(OE1):2.7, Ala673(N):3.3	Ala673(C,CA,CB), Glu672(CG,CD,C), Water321(O)
C4'		Gly675(N), Water133(O)
O4'	Gly675(N):2.8, Water133(O):2.6	Gly675(CA,C,O), Thr676(N), Ser674(C,CB), Asn484(ND2)
C5'		Gly135(C), Leu136(N), Water133(O)
O5'		His377(ND1,CB), Leu136(N,CB)
C6'		Gly135(C,O), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(N,CA)
O6'	Asn484(ND2):2.8, His377(ND1):2.7	Leu139(CD2), Val455(CG1,CG2), Asn484(CG), His377(CG,CE1)
C1		Asn284(ND2), His377(O), Water311(O)
N2	His377(O):2.9	Asn284(ND2), His377(C,CB), Thr378(CG2)
N3		Asn284(ND2,CG,OD1), His377(CB,O), Thr378(CG2)
C4		Asn284(N), Water311(O)
N5	Water311(O):2.8	Leu136(CB), Asn284(ND2)
C6		Asn284(N)
C7		Asn284(N,CA)

C8		Asn284(N), Asn282(O), His341(CE1,NE2)
C9		Glu88(OE2), Asn282(O), His341(CE1), Water216(O), Water330(O)
C10		Glu88(CD,OE2), Asn282(O), Water216(O)
C11		Leu136(CB), Water311(O)
C12		Asn284(N,CA), Water351(O)
C13		Ala383(CB,O), Asn284(CA), Phe285(N), Water351(O)
C14		Phe285(N,C,O), Ala383(O), Water351(O)
C15		Asn282(O), Phe285(O), His341(NE2), Water202(O)
Σύνολο	15	99



ΕΙΚΟΝΑ 32: Δομή του μορίου του αναστολέα *Szk158* και απεικόνιση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.



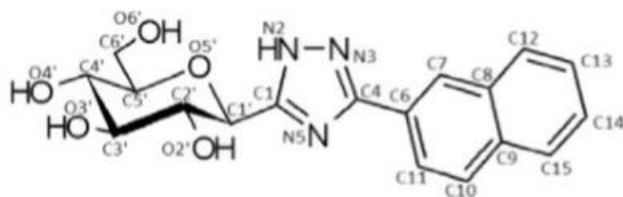
ΕΙΚΟΝΑ 33: Αλληλεπιδράσεις των ατόμων του αναστολέα με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

5. Συζήτηση

Ο διαβήτης τύπου II, είναι η πιο συνηθισμένη μεταβολική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από ανώμαλη έκκριση ινσουλίνης που προκαλείται από δυσλειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων, σε συνδυασμό με ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) αποτελώντας το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, καθώς καταλύει το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί μοριακό στόχο για το σχεδιασμό αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων. Η *GP* βιολογικά είναι ένα ομοδιμερές που έχει ως συμπαραγοντα τη φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*). Η μυϊκή και η ηπατική *GP* εμφανίζουν περίπου 80% ομολογία μεταξύ τους. Οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ ηπατικής και μυϊκής φωσφορυλάσης δεν προκύπτουν από διαφορές στα κατάλοιπα που δεσμεύουν τους προσδέτες. Δεν υπάρχουν προσθήκες ή απαλοιφές στη γονιδιακή αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο του ήπατος σε σύγκριση με την μορφή του ενζύμου του μυός και από τις διαφορές των 171 αμινοξέων μεταξύ των δύο ενζύμων, το 49% (85 αμινοξέα) είναι συντηρητικά και οι περισσότερες διαφορές των αμινοξέων είναι λειτουργικά ουδέτερες, ενώ το ενεργό κέντρο εμφανίζει 100% ομολογία. Η *GP* υπάρχει σε δύο αλληλομετατροπούμενες μορφές, την *GPb*, που έχει χαμηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα (*T*-στερεοδιαμόρφωση) και την *GPa*, η οποία εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα (*R*-στερεοδιαμόρφωση). Η μετατροπή της *b* σε *a* γίνεται με φωσφορυλίωση στη Ser14 της *GPb* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η *GP* διαθέτει 6 γνωστές θέσεις σύνδεσης προσδετών και το καταλυτικό της κέντρο βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών ερευνών. Η πλειοψηφία των ερευνών αυτών εστιάζεται σε ανάλογα γλυκόζης που σχεδιάστηκαν με βάση την αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου, με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών, ώστε να αυξηθούν οι ειδικές αλληλεπιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, μελετήθηκε ο αναστολέας *Szk158* ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το μόριο αυτό είναι ένα ανάλογο C-β-D-γλυκόζης με ένα τριαζολικό δακτύλιο που συνδέει τη γλυκοκυρανόζη με ένα δακτύλιο ναφθαλενίου. Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, κινητικές μελέτες του αναστολέα *Szk158* έναντι της *hlGPa*. Η τιμή της σταθεράς αναστολής που υπολογίστηκε για το μόριο αυτό έναντι της *hlGPa* ήταν $K_i = 11.5 \pm 0.22 \mu\text{M}$. Η τιμή αυτή για τη σταθερά αναστολής *K_i* υποδηλώνει ότι ο αναστολέας εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για την ηπατική φωσφορυλάση *hlGPa*. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δομικές μελέτες στο σύμπλοκο της *rmGPb* με τον *Szk158*. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της *rmGPb* μεταξύ του αναστολέα και των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση του αναστολέα με αμινοξέα του βρόχου 280s (*Asn282*, *Asp283*, *Asn284*, *Phe285*, *Phe286*) παρέχει τη δομική βάση της ισχυρής αυτής ανασταλτικής δράσης, καθώς σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή, προωθώντας επομένως την T στεροδιαμόρφωση (ανενεργή φωσφορυλάση). Επιπλέον, η δομική ανάλυση αποκάλυψε κρίσιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δακτυλίου του τριαζολίου του μορίου *Szk158* (το άτομο N σχηματίζει δ.Η.) και του οξυγόνου της κύριας αλυσίδας της *His377*.

Ένα άλλο μόριο-αναστολέας που εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τον *Szk158* είναι ο **2b** (εικόνα 34). [108] Ο αναστολέας **2b** είναι επίσης ένα ανάλογο γλυκόζης με μία ομάδα ναφθαλενίου που συνδέεται με τη γλυκόζη μέσω ενός τριαζολικού δακτυλίου, αλλά η σταθερά αναστολής του για τη *hlGPa* είναι αρκετά μικρότερη $K_i = 0.216 \pm 0.03 \mu\text{M}$ [108], συγκριτικά με την τιμή της K_i για τον *Szk158* ($11.5 \pm 0.22 \mu\text{M}$).



ΕΙΚΟΝΑ 34: Δομή του αναστολέα **2b**. [108]

Οι δύο αυτές ενώσεις εμφανίζουν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της *GP*, στις οποίες οφείλονται και οι διαφορετικές K_i . Το κοινό σημείο-κλειδί και των δύο μορίων για την πρόσδεσή τους στην καταλυτική περιοχή αποτελεί η γλυκόζη, η οποία εμπλέκεται τόσο σε δεσμούς υδρογόνου (δ.υ.) όσο και σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals*, σχεδόν πανομοιότυπες στα δυο σύμπλοκα. [108] Επιπλέον, και στις δύο δομές ο τριαζολικός δακτύλιος (το άτομο N5 του τριαζολίου) συμμετέχει σε μια αλληλεπίδραση δ.υ. με το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της *His377*.

Όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ των δύο παραπάνω μορίων στις οποίες πιθανότατα να οφείλονται οι διαφορετικές ανασταλτικές δραστηριότητες είναι:

- Ο αναστολέας **2b** σχηματίζει 109 αλληλεπιδράσεις *van der Waals*, ενώ ο αναστολέας **Szk158** σχηματίζει 85 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Αυτή η διαφορά στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων αποτελεί ένα εναρκτήριο σημείο το οποίο μπορεί να αιτιολογήσει τη διαφορά αυτή μεταξύ των σταθερών αναστολής. Οι αλληλεπιδράσεις των αναστολέων με τα κατάλοιπα του βρόχου 280s έχουν ως αποτέλεσμα να σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή, προωθώντας επομένως την T στεροδιαμόρφωση (ανενεργή φωσφορύλαση). Ο αναστολέας **2b** σχηματίζει επιπλέον αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο *Phe286* που συμμετέχει στο βρόχο 280s καθώς επίσης και περισσότερες αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο *His341*. [108] Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5) φαίνονται οι δεσμοί *van der Waals* με τα κατάλοιπα αμινοξέων που σχηματίζει ο **2b** (αριστερή στήλη), καθώς και τα κατάλοιπα του βρόχου 280s (με έντονο μαύρο χρώμα) τα οποία είναι κοινά και για τον **Szk158**:

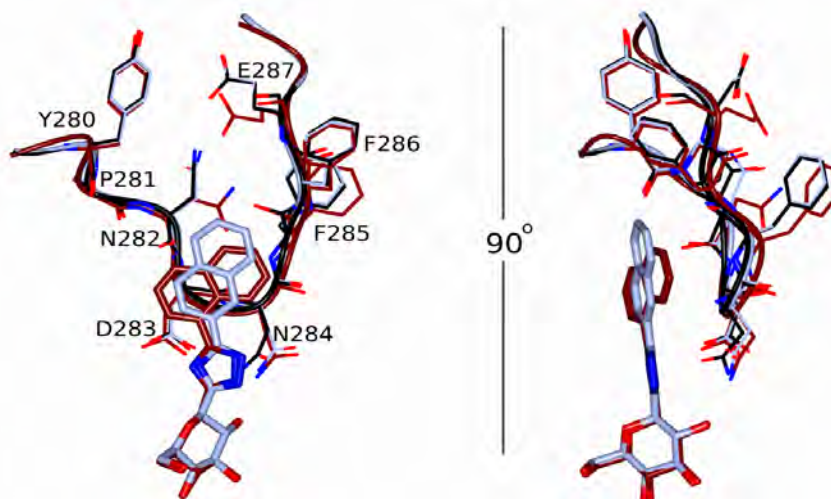
Πίνακας 5:

	2b	Szk158
Van der Waals	Glu88	
	<i>Asn282</i>	
	<i>Asn284</i>	
	<i>Phe285</i>	
	His341	
	Ala383	
	<i>Phe286</i>	
	Arg292	

Οι αλληλεπιδράσεις των αναστολέων με αμινοξέα του βρόχου 280s (*Asn282*, *Asp283*, *Asn284*, *Phe285*, *Phe286*) παρέχουν τη δομική βάση της ισχυρής αυτής ανασταλτικής δράσης, καθώς σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή, προωθώντας επομένως την T στεροδιαμόρφωση (ανενεργή φωσφορύλαση).

- Επιπλέον, η είσοδος και πρόσδεση του **Szk158** στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου εκτοπίζει αρκετά μόρια H₂O, σε σύγκριση με τον **2b** που μετατοπίζει/ανακατατάσσει μόνο τρία μόρια ύδατος σε αυτήν την περιοχή. Πέραν της εκτόπισης των μορίων ύδατος, με την πρόσδεση του **2b** προκαλείται μια έντονη αλλαγή της δομής της GP, με την πλευρική αλυσίδα

της Arg60 να μετατοπίζεται κατά περίπου 3.0 Å και αυτή η αλλαγή με τη σειρά της προκαλεί τη μετακίνηση της έλικας που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 60-64. [108]Επίσης, η δομική ανάλυση με υπέρθεση του συμπλόκου *rmGPb-SzK158* με την ελεύθερη δομή (απουσία προσδέτη) αλλά και των δύο συμπλόκων μεταξύ τους ανέδειξε ορισμένες σημαντικές μετατοπίσεις των αμινοξέων που συμμετέχουν στο βρόχο 280s με r.m.s.d. στα 1.02 Å και 0.87 Å αντίστοιχα. Στην εικόνα 35 παρουσιάζεται η υπέρθεση των συμπλόκων *rmGPb-SzK158*, *rmGPb-2b* ως προς την ελεύθερη δομή (T διαμόρφωση). Παρατηρούμε ότι η πρόσδεση του **2b** οδηγεί σε μικρές μετακινήσεις του βρόχου 280s και με αυτό το τρόπο προσδένεται χωρίς μεγάλο ενεργειακό κόστος και σταθεροποιεί το ένζυμο στην ανενεργή μορφή. Αντίθετα, η πρόσδεση του *SzK158* οδηγεί σε μεγάλη διαταραχή του βρόχου κάτι το οποίο συνεπάγεται με ένα ενεργειακό κόστος προκειμένου να μπορέσει να επιτευχθεί η πρόσδεση του αναστολέα. Επομένως, η μετατόπιση του βρόχου 280s από την κατάσταση που βρίσκεται στην ελεύθερη μορφή (T διαμόρφωση) είναι άλλη μια αιτία που οδηγεί σε μειωμένη βιοδραστικότητα.



ΕΙΚΟΝΑ 35: Υπέρθεση των συμπλόκων *rmGPb-2b* (γκρι χρώμα), *rmGPb-SzK158* (κόκκινο) ως προς την ελεύθερη δομή (απουσία προσδέτη, μαύρο χρώμα).

- Τέλος, ο **2b** προσδένεται και στο νέο αλλοστερικό κέντρο (όπως προκύπτει από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα) [108], σε αντίθεση με τον *SzK158* ο οποίος δεν εμφανίζει αλληλεπιδράσεις - δεσμούς με κατάλοιπα του νέου αλλοστερικού κέντρου. Βέβαια, η πρόσδεση του **2b** σε αυτό το κέντρο δεν είναι πλήρης, με την κύρια θέση πρόσδεσης να εξακολουθεί να αποτελεί το καταλυτικό κέντρο. Η πρόσδεση στο νέο αλλοστερικό κέντρο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της συγκέντρωσης του διαλύματος του αναστολέα **2b** για

τις κρυσταλλογραφικές μελέτες που ήταν 10 mM ενώ η συγκέντρωση του αναστολέα *SzKI58* ήταν 1 mM.

Για να συνοψίσουμε, απώτερος σκοπός της έρευνας αυτής που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, αποτελεί η εύρεση μικρών μορίων που θα μπορούν να αναστέλλουν ισχυρά, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και άλλα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού του καταβολισμού του γλυκογόνου, όπως είναι η κινάση της φωσφορυλάσης και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. Για το σκοπό αυτό, απαιτούνται συνεχώς εκ νέου έρευνες και αξιόπιστα αποτελέσματα προκειμένου να προχωρήσουν τα πειράματα αυτά και σε κλινικό στάδιο.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α. ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ

[1], [20]: Βιοχημεία-Κλινικοί συσχετισμοί, Thomas M. Delvin, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2009.

[2], [3], [11], [31], [32], [39], [64], [65], [66], [67], [71], [73]. [76]: Βιοχημεία, Berg Jeremy M., Tymoczko John L., Stryer Lubert, 7^η έκδοση.

[6]: Βιοχημεία της άσκησης, Vassilis C. Mougios, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2008.

[7], [10], [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18]: Ιατρική Φυσιολογία, Guyton and Hall, εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2013.

[75]: Κλώνης Ι. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007.

[88]: Καραϊσκάκης Γ. Φυσικοχημεία. Π Τραυλός 1998.

Β. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

[4]: Beckett GJ. Lecture notes. Clinical biochemistry. 7th ed. Malden, Mass., USA: Blackwell Pub.; 2005.

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

[9]: Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2003;26 Suppl 1:S5-20.

[21]: Cellular Signal Processing, f. Marks, U. Kling muller and K. Muller-Decker, Garland science editions.

[22]: R.J. Brushia, D.A. Walsh, Phosphorylase Kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure, Front. Biosci 4 (1999) D618-D641.

[23]: R.J. Fletterick, S. Sprang, N.B. Madsen, Analysis of the surface topography of glycogen phosphorylase a: implications for metabolic interconversion and regulatory mechanisms, Can. J. Biochem. 57(1979) 789-797.

- [24]: E.J. Goldsmith, R. Akella, X.min, T. Zhou, J.M. Humphreys, substrate and docking interactions in serine/threonine protein kinases, *Chem. Rev*, 107(2007) 5065-5081.
- [25]: E.D. Lowe, M.E. Noble, V.T. Skamnaki, N.G. Oikonomakos, D.J. Owen, L.N. Johnson, The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition, *EMBO J*. 16(1997) 6646-6658.
- [26]: Y.H. Xu, G.M. Carlson, Structural features contributing to complex formation between glycogen phosphorylase and phosphorylase kinase, *Biochemistry* 38(1997) 9562-9569.
- [27]: Creative Biolabs, Two hybrid services.
- [28]: I.E. Andreeva, N.A. Rice, G.M. Carlson. The regulatory a subunit of phosphorylase kinase may directly participate in the binding of glycogen phosphorylase, *Biochem-Mosc.* + 67(2002) 1197-1202.
- [29]: J.F. Takrama, D.J. Graves, Solution conformations of the N-terminal CNBr fragment of glycogen phosphorylase and its interaction with calmodulin, *Biochim, Biophys. Acta* 1077(1991) 371-378.
- [30]: Jackie A. Thompson, Gerald M. Carlson, The regulatory a and b subunits of phosphorylase kinase directly interact with its substrate, glycogen phosphorylase.
- [33]: Essential cell biology, second edition, alberts, bray, hopkin, Johnson, lewis, raff, Roberts, walter / Broken Hill 2011.
- [34]: Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept Sci* 2002;3;561-86.
- [35]: Hayes et al., 2014; Somak, 2011; Somak et al., 2008.
- [36]: Rath et al., 2000a.
- [37]: Van der Waals interactions govern C- β -D-glucopyranosyl triazoles' nM inhibitory potency in human liver glycogen phosphorylase, 2017. Anastassia L. Kantsadi, George A. Stravodimos, Efthymios Kyriakis, Demetra S.M. Chatzileontiadou, Theodora G.A. Solovou, Sandor Kun, Eva Bokor, Laszlo Somsak, Demetres D. Leonidas.
- [38]: Efthymios Kyriakis, Larisa 2016, Kinetic and crystallographic studies on the binding of C- β -D-Glucose derivatives to glycogen phosphorylase.
- [40]: Oikonomakos NG, Zografos SA, Skamnaki VT, Archontis G. The 1,76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose and CP320626, a potential antidiabetic drug. *BioorgMedChem* 2002;10;13 13-9.

[41]: Barford D, Johnson LN. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 1989;340:609-16.

[42]: Fletterick R.J, Sprang SR. Glycogen – Phosphorylase structures and function. *Accounts of chemical Research* 1982;15:361-9.

[43]: Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification by products of *Vitis Vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem toxicol.* 2014;67:35-43.

[44]: Barford D, Johnson LN. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 1989;340:609-16.

[45]: Sprang SR, Withers SG, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science* 1991;254:1367- 71.

[46]: Martin JL, Johnson LN, Withers SG. Comparison of the binding of glucose and glucose 1- phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b. *Biochemistry* 1990;29:10745-57.

[47]: JohnsonLN, AcharyaKR, JordanMD, McLaughlinPJ. Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex. *J Mol Biol* 1990;211:645- 61.

[48]: Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Oikonomakos NG. Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug. *Arch Biochem Biophys*2000;384:245-54.

[49]: Oikonomakos NG, Zographos SE, Skamnaki VT, Archontis G. The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *Bioorg Med Chem*2002;10:1313-9.

[50]: Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 2014;67:35-43.

[51]: 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.

[52], [53]: Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3:561-86.], [Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.

[54]: Martin JL, Johnson LN, Withers SG. Comparison of the binding of glucose and glucose 1- phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b. *Biochemistry* 1990;29:10745-57.

[55]: Johnson LN. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J* 1992;6:2274-82.

- [56]: Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3:561-86.
- [57]: Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci*2003;12:1914-24.
- [58]: Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Oikonomakos NG. Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug. *Arch Biochem Biophys*2000;384:245-54.], [Papageorgiou AC, Oikonomakos NG, Leonidas DD. Inhibition of rabbit muscle glycogen phosphorylase by D-gluconohydroximo-1,5-lactone-N-phenylurethane. *ArchBiochemBiophys*1989;272:376-85.
- [59]: OikonomakosNG, SchnierJB, ZographosSE, SkamnakiVT, TsitsanouKE, JohnsonLN. Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J Biol Chem* 2000;275:34566-73.
- [60]: OikonomakosNG, ZographosSE, SkamnakiVT, ArchontisG. The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *BioorgMedChem*2002;10:1313-9.
- [61]: KantsadiAL, ApostolouA, TheofanousS, StravodimosGA, KyriakisE, GorgogietasVA, et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 2014;67:35-43.
- [62]: JakobsS, FridrichD, HofemS, PahlkeG, EisenbrandG. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *MolNutrFoodRes*2006;50:52-7.
- [63]: J. Monod, J. Wyman, J-P. Changeux, On the nature of allosteric transition. A plausible model, *J. Mol. Biol.* (1965) 12, 88-118.
- [68]: Rath VL, Ammirati M, Danley DE, Ekstrom JL, Gibbs EM, Hynes TR, et al. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *ChemBiol*2000;7:677-82.
- [69]: Hayes JM, Leonidas DD. Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design. *Mini Rev Med Chem* 2010;10:1156-74.
- [70]: Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 2011;50:8264-9.
- [72]: *Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*, 3rd Edition, Nicolas C. Price, Lewis Stevens, εδάφιο 4.3
- [74]: Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol*1965;12:88-118.
- [77]: Roque AC, Lowe CR. Affinity chromatography: history, perspectives, limitations and prospects. *Methods Mol Biol* 2008;421:1-21.

[78]: Dermot Walls and Sinéad T. Loughran, Protein Chromatography Methods and Protocols, School of Biotechnology and National Centre for Sensor Research, Dublin City University, Dublin, Ireland, DOI 10.1007/978-1-60761-913-0.

[79]: Chunxia Zhao, Lance M. Hellman, Xin Zhan, Willis S. Bowman, Sidney W. Whiteheart, and Michael G. Fried, Hexahistidine-Tag-Specific Optical Probes for Analyses of Proteins and Their Interactions, *Anal Biochem.* 2010 April 15; 399(2): 237–245. doi:10.1016/j.ab.2009.12.028.

[80]: HealthCare G. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: GE HealthCare; 2010.

[81]: José Arnau, Conni Lauritzen, Gitte E. Petersen, John Pedersen, Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins, Unizyme Laboratories A/S, Dr. Neergaards vej 17, DK-2970 Hørsholm, Denmark Available online 28 December 2005.

[82]: David S. Waugh Protein Engineering Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick, P.O. Box B, Frederick, MD, 21702-1201, USA An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags, *Protein Expr Purif.* 2011 December ; 80(2): 283–293. doi:10.1016/j.pep.2011.08.005.

[83]: Davey J, Lord M. *Essential cell biology: a practical approach.* Oxford ; New York: Oxford University Press; 2003.

[84]: Stallforth P, Clardy J. X-ray crystallography: One size fits most. *Nature* 2013;495:456-7.

[85]: Kesan E. van Holde, W. Curtis Johnson, P. Shing Ho, *Principles of Physical Biochemistry* 2nd edition, PEARSON Prentice Hall, 2006.

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

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

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

[90]: Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 2008;275:1-21.

[91], [92]: Oikonomakos et al., 1985.

- [93]: Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985;148:277-81.
- [94]: Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985;148:277-81.
- [95]: Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998.
- [96]: Rhodes G. Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006.
- [97]: 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.
- [98]: Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [99]: COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.
- [100]: Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.
- [101]: Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.
- [102]: 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.
- [103]: Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [104]: COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.
- [105]: 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.
- [106]: Chiasson JL, Aris-Jilwan N, Belanger R, Bertrand S, Beauregard H, Ekoe JM, et al. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *CMAJ* 2003;168:859-66.

[107]: Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? Science 2005;307:380-4.

[108]:van der Waals interactions govern C-beta-d-glucopyranosyl triazoles' nM inhibitory potency in human liver glycogen phosphorylase. Kantsadi, A.L., Stravodimos, G.A., Kyriakis, E., Chatzileontiadou, D.S.M., Solovou, T.G.A., Kun, S., Bokor, E., Somsak, L., Leonidas, D.D.

Kantsadi, A.L., Stravodimos, G.A., Kyriakis, E., Chatzileontiadou, D.S.M., Solovou, T.G.A., Kun, S., Bokor, E., Somsak, L., Leonidas, D.D.