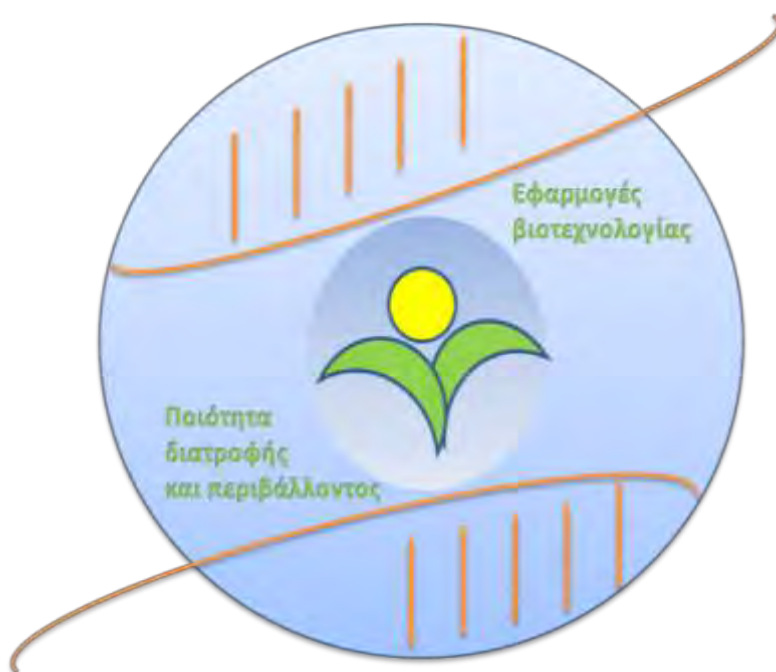


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και
Περιβάλλοντος

Γκούσκου Αναστασία



Λάρισα 2018

Κινητικές και δομικές μελέτες
σύνδεσης αναστολέων φυσικής
προέλευσης στην κινάση της
φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Kinetic and structural studies on
natural derivative inhibitors on
glycogen phosphorylase kinase

Κινητικές και δομικές μελέτες σύνδεσης αναστολέων φυσικής προέλευσης στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Όνομα: Γκούσκου Αναστασία

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Βασιλική Σκαμνάκη

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Σκαμνάκη Βασιλική

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
Περίληψη.....	7
Abstract	7
Εισαγωγή	8
Φωσφορυλίωση - Πρωτεϊνικές Κινάσες.....	8
Αναστολείς κινασών.....	11
Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών.....	12
Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)	13
Το μοντέλο Michaelis-Menten και οι κινητικές ιδιότητες των ενζύμων.....	25
Αναστολείς της PhK.....	26
Ανάλογα Ινδιρουβίνης και Σταυροσπορίνης	26
Κουμαρίνες	26
Σκοπός	27
Υλικά – Μέθοδοι.....	28
Αντιδραστήρια	28
Όργανα	29
Κύτταρα-Πλασμίδια	29
Στήλες.....	30
Αναστολείς.....	30
Μεθοδολογία.....	31
Παρασκευαστικές Μέθοδοι	31
Υπερέκφραση και καθαρισμός μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmPhK).....	31
Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....	33
Απομόνωση και καθαρισμού της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb).....	34
ΥΛΙΚΑ:	34
Πειραματική Διαδικασία:	34
Αναλυτικές Μέθοδοι.....	37
Κινητικές μελέτες	37
Προσδιορισμός φωσφόρου.....	40
Μέθοδος ασκορβικού οξέος.....	40
Σάρωση αναστολέων.....	40
Προσδιορισμός IC50 αναστολέα.....	41

Μελέτη αναστολής στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου	42
Ανάλυση κινητικών δεδομένων	43
<i>In silico</i> μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης.....	43
Δομικές αναλύσεις <i>in silico</i>	44
Εύρεση αλληλεπιδράσεων	44
Στοίχιση αλληλουχιών	45
Αποτελέσματα-Συζήτηση	47
Κινητικές Μελέτες.....	51
Σάρωση αναστολέων.....	51
Προσδιορισμός IC50.....	55
Μελέτη αναστολής στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου	56
<i>In silico</i> δομικές μελέτες-Εύρεση αλληλεπιδράσεων.....	57
Στοίχιση αλληλουχιών	59
Δομική Υπέρθεση	61
Συζήτηση.....	61
Παράρτημα.....	62
Συνομογραφίες.....	62
Διαλύματα	63
Βιβλιογραφία.....	66

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος, Βασιλικής Σκαμνάκη.

Φτάνοντας στο τέλος αυτής της ερευνητικής προσπάθειας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα. Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Λέκτορα Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, που δέχτηκε για δεύτερη φορά να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή της δίνοντάς μου την ευκαιρία να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες στον τομέα της Βιοχημείας. Ακόμα θα πρέπει να αναφέρω ξεχωριστά τον καθηγητή Joseph Hayes που πραγματοποίησε το docking των αναστολέων και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοφυσικής Δρ. Παπαδόπουλο Γεώργιο για την βοήθειά του στις *in silico* μελέτες.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη στήριξη, τη βοήθειά τους αλλά και το ευχάριστο περιβάλλον. Ξεχωριστή θέση κατέχουν ο Δρ. Γιώργος Στραβοδήμος καθώς και οι υποψήφιοι διδάκτορες Θεοδώρα Σολοβού, Θύμιος Κυριάκης, Ραφαέλα Μπέτα για τη στήριξή τους σε επιστημονικό και φιλικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ στην οικογένεια μου για τη συνεχή και αταλάντευτη συμπαράσταση και εμπύχωση που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η κινάση φωσφορυλάσης γλυκογόνου (PhK) καταλύει την εξαρτώμενη από Ca^{2+} φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης γλυκογόνου (GP), μετατρέποντας έτσι την ανενεργή GPb σε ενεργό GPa.[1, 2] Μελέτες σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα έχουν προσδιορίσει τη PhK ως νέο θεραπευτικό στόχο τόσο για τον διαβήτη τύπου 2 όσο και για τον καρκίνο.[3] Οι κουμαρίνες περιλαμβάνουν μια ευρεία κατηγορία παραγώγων 1,2 βενζοπυρόνης ευρέως εντοπισμένων σε φυτά, μύκητες και βακτήρια ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού με ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες. Μεταξύ άλλων φαρμακολογικών χρήσεων, οι κουμαρίνες αναστέλλουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες-στόχους και ένζυμα συμπεριλαμβανομένου και σημαντικού αριθμού κινασών.[4]

Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκε μια σειρά από 38 φυσικά παράγωγα κουμαρίνης ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της PhK. Τα κινητικά πειράματα ανέδειξαν τους καλύτερους δύο αναστολείς GB-P2-4a και GB-P2-4'a που εμφάνισαν μέτρια αναστολή με τιμές IC_{50} 95 και 102 μM έναντι της μυϊκής ισομορφής της PhK (rmPhK) από σκελετικούς μυς κουνελιού και 61,5 και 50,5 μM έναντι της ανθρώπινης ηπατικής ισομορφής της PhK (hPhK). In silico μελέτες induced fit docking (IFD) έδειξαν ότι και οι δύο ενώσεις συνδέονται στη περιοχή πρόσδεσης του ATP με διαφορετικούς τρόπους στην κάθε μια απ τις δύο ισομορφες μέσω της συμπληρωματικότητας της δομής τους και πολυάριθμων αλληλεπιδράσεων van der Waals με κατάλοιπα αμινοξέων που βρίσκονται στην υδρόφοβη εσοχή παρακείμενα στην θέση σύνδεσης του δακτυλίου αδενίνης του ATP. Μελέτες στοιχίσης αλληλουχιών αποκάλυψαν ότι μερικά από αυτά τα κατάλοιπα δεν συντηρούνται ισχυρά μεταξύ των πρωτεϊνικών κινασών και οι αλληλεπιδράσεις τους με προσδέτες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για το σχεδιασμό εξειδικευμένων αναστολέων. Οι αναστολείς είναι τύπου I, στοχεύουν δηλαδή στην DFG-in συνεχώς ενεργή μορφή της PhK. Η αλληλεπίδραση του GB-P2-4'a με το Asp171 της DFG περιοχής ενεργοποίησης παρεμποδίζει περαιτέρω την σύνδεση $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ ενώ ο αναστολέας GB-P2-4a συνδέεται κυρίως μέσω δεσμού αλογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Abstract

Glycogen phosphorylase kinase (PhK) catalyzes the Ca^{2+} dependent phosphorylation of glycogen phosphorylase (GP), thus converting inactive GPb into active GPa. Studies on cellular and animal models have identified PhK as a novel therapeutic target for both type 2 diabetes and cancer. Coumarins comprise a broad class of 1,2 benzopyrone derivatives widely distributed in plants, fungi and bacteria as secondary metabolism products with diverse pharmacological properties. Among other pharmacological uses, coumarins inhibit various different target proteins and enzymes, which contain a significant number of kinases.

In this study a series of 38 natural coumarin derivatives were assessed for inhibitory potency towards PhK. The kinetic experiments revealed the best two inhibitors GB-P2-4a and GB-P2-4'a exhibited moderate inhibition with IC50 values 95 and 102 μ M against rabbit muscle PhK (rmPhK) and 61.5 and 50.5 μ M against human liver PhK (hPhK) isoform. Induced Fit Docking studies showed that both compounds bind to the ATP binding site in different modes in each of the two isoforms through complementarity of structure and numerous van der Waals interactions with residues accommodating pockets adjacent to adenine ring binding site. Sequence alignment studies revealed that some of these residues are not conserved among kinases and their ligand-binding interactions could be exploited to design specific inhibitors. The inhibitors are Type I, thus targeting the DFG-in area of constitutively active PhK. The interaction of GB-P2-4'a with Asp171 of the DFG reactive domain further blocks ATP / Mg²⁺ + binding while the GB-P2-4a inhibitor binds via halogen bonds and hydrophobic interactions.

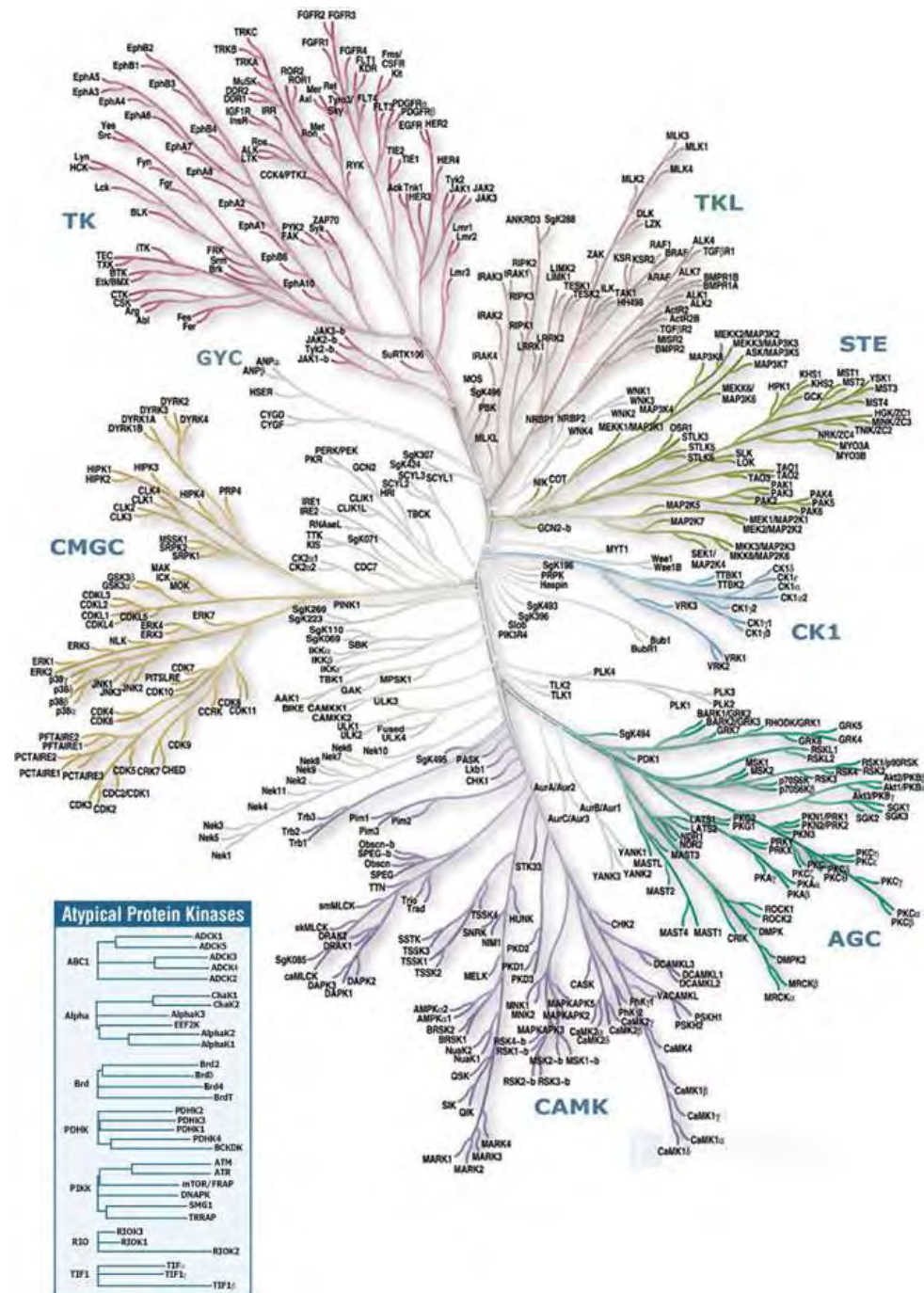
Εισαγωγή

Φωσφορυλίωση - Πρωτεϊνικές Κινάσες.

Οι ομοιοπολικές, αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές, τροποποιήσεις που ακολουθούν την μετάφραση των πρωτεϊνών όπως φωσφορυλίωση, αδενυλίωση, ακυλίωση, ουριδιλίωση, μεθυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση κ.α. είναι καθοριστικές, για να επιτελέσουν οι πρωτεΐνες το βιολογικό τους ρόλο. Βασικό μηχανισμό ρύθμισης των βιολογικών συστημάτων αποτελεί η τροποποίηση των πρωτεϊνών με φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση όπως καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και πρωτεϊνικές φωσφατάσες αντίστοιχα.[5]

Η πρόσδεση της φωσφορικής ομάδας που αποτελείται από τέσσερα άτομα οξυγόνου συμμετέχει εκτεταμένα σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου οι οποίοι συνδέουν διάφορα μέρη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μιας πρωτεΐνης [6] και προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της, κοντά ή μακριά, στην περιοχή φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα την αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια προάγεται ή αναστέλλεται η βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος σε ενδοκυτταρικές μεταβολικές διαδικασίες ή σχετίζονται με γονιδιακή έκφραση, κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα, κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση μπορεί να αλλάξει την επιφανειακή διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης με συνέπειες στην αναγνώριση της από άλλες πρωτεΐνες ή να προάγει την κατάλληλη διαμόρφωση για αναγνώριση και σύνδεση των υποστρωμάτων (σε περιπτώσεις ενζύμων) καθώς και ρυθμιστικών υπομονάδων. Μπορεί επίσης να προκαλεί αλλαγές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης. Παρόμοιες αλλαγές μπορούν να παρατηρηθούν και με την αλλοστερική τροποποίηση της. Τέλος είναι δυνατόν να μην προκληθεί καμιά αλλαγή διαμόρφωσης, όπως στην περίπτωση των "σιωπηλών" φωσφορυλιώσεων κατά τις

οποίες οι περιοχές φωσφορλίωσης βρίσκονται σε σημεία του μορίου που δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις.

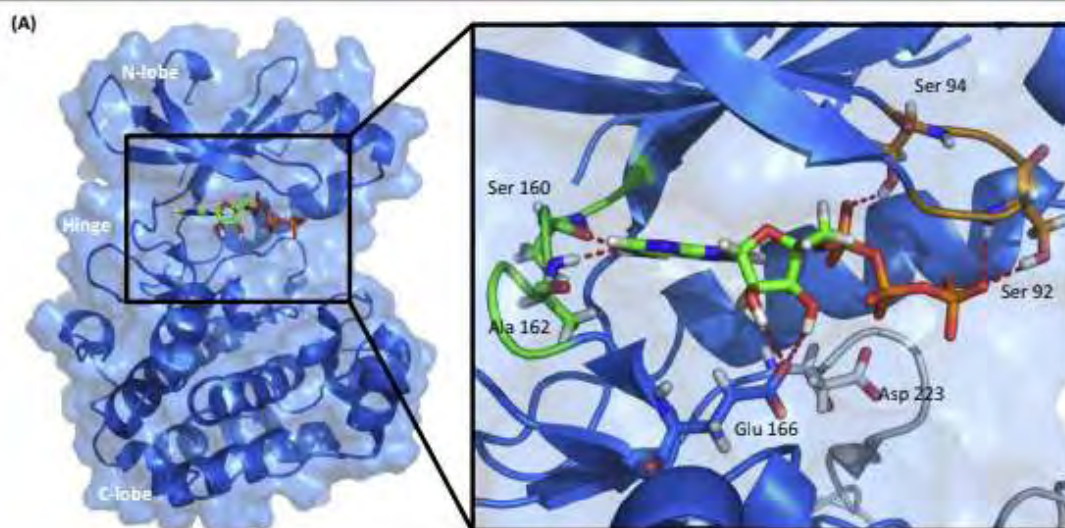


Εικόνα 1 Διάγραμμα με το σύνολο των πρωτεϊνικών κινάσων διαχωρισμένες με βάση την αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Στον πίνακα κάτω αριστερά παρουσιάζονται οι ατυπικές πρωτεϊνικές κινάσες. (<https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-human-protein-kinases-overview/kinases-human-protein>)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες καταλύουν την αντιστρεπτή φωσφορλίωση. Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) είναι τα ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP ή GTP όπως στην περίπτωση της κινάσης της καζεΐνης II [7] κυρίως σε μια σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη

των πρωτεϊνικών τους υποστρωμάτων [8]. Είναι γνωστή όμως και η περίπτωση της πρωτεϊνικής κινάσης της ιστόνης H4 η οποία φωσφορυλιώνει ιστιδίνη [9]. Μία επιπλέον κατηγορία κινασών είναι οι ατυπικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες έχουν βιοχημική δράση κινάσης, αλλά δεν παρουσιάζαν ομοιότητα ως προς την αλληλουχία με την περιοχή των *ePK*. [10] (Εικόνα 3). Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες φαίνεται πως συμμετέχουν σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών και μάλιστα το 1968 μελετήθηκε το μονοπάτι που συμπεριλαμβάνει την PKA. [11]

Η καταλυτική περιοχή των κινασών παρουσιάζει υψηλή συντήρηση. Η πρώτη τρισδιάστατη δομή καταλυτικής περιοχής κινάσης που προσδιορίστηκε το 1991, είναι αυτή της cAPK (cAMP-εξαρτώμενη από ATP κινάση PDB ID: 2CPK), με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X [12]. Κοινό χαρακτηριστικό των κινασών αποτελεί το αμινοτελικό τους άκρο, το οποίο αποτελείται κυρίως από β-πτυχωτά φύλλα και είναι συνδεδεμένο με ένα μεγαλύτερο καρβοξυτελικό τελικό άκρο που σχηματίζεται κυρίως από α-έλικες [13]. Επιπλέον κοινό χαρακτηριστικό είναι ο βρόχος ενεργοποίησης (activation loop) που περιλαμβάνει και τη θέση πρόσδεσης του ATP καθώς και μια συντηρημένη αλληλουχία που ξεκινάει με Asp-Phe-Gly (DFG) και τελειώνει με APE που ελέγχει την πρόσβαση στην περιοχή αυτή και η οποία περιλαμβάνεται σε μικρή υδρόφοβη περιοχή. [14, 15] Η ATP περιοχή αυτή ελέγχει επιπλέον τη σύνδεση του ATP και το σωστό προσανατολισμό των υποστρωμάτων. Η οικογένεια των κινασών αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα. [16] (Εικόνα 4)

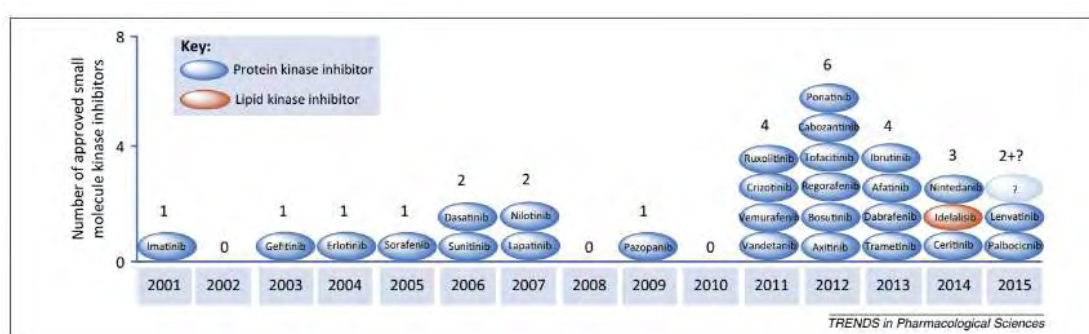


Εικόνα 2 Η δομή των κινασών. Συγκρυστάλλωση της PDK1 με το ATP (αδενίνη και ριβόζη με πράσινο, φωσφορικές ομάδες με πορτοκαλί) Η περιοχή στο τετράγωνο απεικονίζει τα δομικά στοιχεία της περιοχής πρόσδεσης του ATP. [14]

Οι κινάσες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους στόχους για την ανακάλυψη φαρμάκων τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις και η δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες [13]. Μέχρι το 2015 έχουν εγκριθεί 28 φάρμακα που στοχεύουν σε κινάσες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων (FDA). Το 2001 εγκρίθηκε από τον FDA η

ένωση Imatinib (Gleevec) με σκοπό τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα φάρμακα αυτά συνδέονται στη θέση πρόσδεσης του ATP [17].

Όπως προαναφέρθηκε οι κινάσες παρουσιάζουν πολύ συντηρημένη δομή στα κατάλοιπα της καταλυτικής περιοχής. Ωστόσο πολλές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν μοναδική και διαφορετική φυσιολογική λειτουργία. Η δραστηριότητα των πρωτεϊνικών κινασών υπόκειται γενικά σε αυστηρό ρυθμιστικό έλεγχο. Για τη ρύθμισή τους δέχονται σήματα σε συγκεκριμένες περιοχές. Ορισμένες κινάσες έχουν περισσότερες από μία ρυθμιστικές υπομονάδες ή περιοχές και η δραστηριότητά φωσφομεταφοράς μπορεί να επηρεαστεί από περισσότερα του ενός σήματα. Παράλληλα, μερικά σήματα μπορούν να ενεργοποιήσουν πολλές κινάσες.

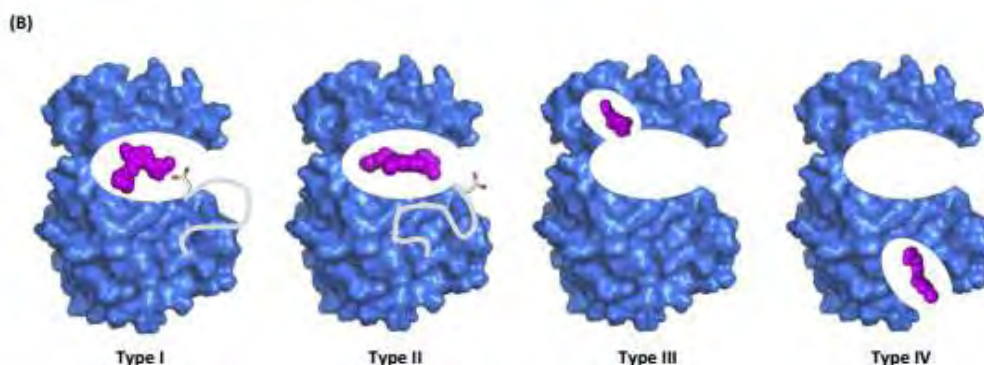


Εικόνα 3 Τα φάρμακα που στοχεύουν σε κινάσες από το 2001 (Imatinib) έως το 2015. Παρατηρείται αύξηση τα τελευταία χρόνια[17]

Αναστολείς κινασών

Οι αναστολείς των κινασών χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τον τρόπο σύνδεσής τους στις κινάσες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι αναστολείς που συνδέονται μη αντιστρεπτά σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που εντοπίζεται κοντά στο κέντρο σύνδεσης του ATP. Κατά αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζουν την σύνδεση στην περιοχή του ATP μη αντιστρεπτά. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αναστολείς οι οποίοι συνδέονται αντιστρεπτά είτε στην περιοχή δέσμευσης του ATP, είτε στην συντηρημένη περιοχή DFG. Οι αναστολείς της δεύτερης κατηγορίας μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις επιπλέον κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ATP-συναγωνιστικοί αναστολείς που συνδέονται στο κατάλοιπο Ασπαραγινικού στο DFG μοτίβο σε ενεργές κινάσες (Type I). Στις ενεργές κινάσες το κατάλοιπο αυτό έχει προσανατολισμό προς το εσωτερικό της κινάσης. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αναστολείς που συνδέονται στην ίδια περιοχή αλλά σε μη ενεργές κινάσες και με διαφορετικό προσανατολισμό (Type II). Στην τρίτη κατηγορία, οι αναστολείς προσδένονται σε μια αλλοστερική περιοχή του ενζύμου που εντοπίζεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν με αυτή (Type III). Τέλος στην τέταρτη κατηγορία ανήκουν οι αναστολείς που συνδέονται σε αλλοστερική θέση μακριά από τη θέση πρόσδεσης του ATP (Type IV).[14]

Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη ανήκουν στην πρώτη κατηγορία. Η κινάση παίρνει μια τέτοια διαμόρφωση παρόμοια με αυτή κατά τη σύνδεσή της με το ATP και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στα κατάλοιπα DFG.[15]



Εικόνα 4 Οι τέσσερις τύποι αναστολέων κινασών. Τυπος I: ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς που συνδέονται στο κατάλοιπο Ασπαραγινικού στο DFG μοτίβο σε ενεργές κινάσες . Τύπος II : αναστολείς που συνδέονται στην ίδια περιοχή αλλά σε μη ενεργές κινάσες και με διαφορετικό προσανατολισμό. Τύπος III : αναστολείς που προσδένονται σε μια αλλοστερική περιοχή του ενζύμου που εντοπίζεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν με αυτή .Τύπος IV: αναστολείς που συνδέονται σε αλλοστερική θέση μακριά από τη θέση πρόσδεσης του ATP [14]

Το γεγονός ότι η καταλυτική περιοχή των κινασών παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης, δυσχεραίνει τους ερευνητές να βρουν αναστολείς με εξειδικευμένη δράση. Όμως τη δεκαετία του 80 αυτό καταρρίφθηκε με την ανακάλυψη του αναστολέα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)[14]

Ως παρεμποδιστές της ενεργότητας των ενζύμων μπορούν να δρουν πολλά και ποικίλα υποστρώματα.

Τύποι ενζυμικής αναστολής:

- ανταγωνιστική αναστολή: μόρια που ανταγωνίζονται εκείνα του υποστρώματος με τα οποία παρουσιάζουν κοινά στοιχεία, για το ενεργό κέντρο του ενζύμου, με το οποίο δεν συνδέονται μόνιμα
- μη ανταγωνιστική αναστολή: ένα μόριο συνδέεται με το ένζυμο αλλά σε άλλη θέση από εκείνη του ενεργού κέντρου, με τον τρόπο αυτό επηρεάζεται η δομή του ενεργού κέντρου. Η περιοχή αυτή εκτός του ενεργού κέντρου είναι γνωστή ως αλλοστερική περιοχή και το ένζυμο αναφέρεται ως αλλοστερικό
- μη αντιστρεπτή αναστολή: είναι η διαδικασία κατά την οποία το ένζυμο απενεργοποιείται μόνιμα με τη σύνδεση του μορίου αναστολέα. Ο μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο λόγω της ισχυρής σύνδεσής του με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.

Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών

Το αμινοξύ που φωσφορυλιώνουν είναι κριτήριο κατάταξης των κινασών [8]. Έτσι διακρίνονται σε : (α) κινάσες σερίνης / θρεονίνης, (β) κινάσες τυροσίνης, (γ) κινάσες διπλής εξειδίκευσης, ικανές να φωσφορυλιώνουν σερίνη / θρεονίνη και τυροσίνη. Οι κινάσες σερίνης / θρεονίνης εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυώτες σε αντίθεση με τις κινάσες τυροσίνης που είναι εξελικτικά πιο σύγχρονες και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία και την κυτταρική ανάπτυξη. Ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία ενισχύουν την άποψη ότι όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες μοιράζονται μια κοινή περιοχή 270 περίπου αμινοξέων [18].

Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε το 1955 από τους Fischer, Graves και Krebs και απομονώθηκε από τον Krebs το 1964 από σκελετικό μυ κουνελιού. Το μοριακό της βάρος έχει υπολογιστεί στα $1,3 \times 10^6$ Da. Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς (α,β,γ,δ)₄. Οι υπομονάδες α, β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα [19]. Η PhK παίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της γλυκογονόλυσης. Φωσφορυλιώνει την ανενεργό φωσφορυλάση (GP) του γλυκογόνου b (GPb) και τη μετατρέπει στην ενεργό φωσφορυλάση a (GPa) *in vivo*, αν και έχει βρεθεί ότι και άλλες πρωτεΐνες λειτουργούν ως υποστρώματά της *in vitro*, όπως η συνθάση του γλυκογόνου, η τροπονίνη I και η τροπονίνη T [19]. Η ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης σε ένα κατάλοιπο σερίνης (ser14). Η PhK ενεργοποιείται ανταποκρινόμενη σε σήματα από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια- ορμόνες (πχ αδρεναλίνη, γλυκαγόνη), νευρικά ερεθίσματα (Ca²⁺) και μεταβολικά σήματα (πχ επίπεδα ADP) - ώστε να προκαλέσει την ταχεία κινητοποίηση του αποθηκευμένου γλυκογόνου. [20].

Ισομορφές της PhK.

Η PhK εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών -κυρίως στους μυς, στο ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η PhK του εγκεφάλου απαντάται στα αστρογλοιακά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου. Στους μύες, η ενεργοποίησή της συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης του Ca²⁺ από το σαρκοπλασματικό δίκτυο ως ανταπόκριση στη συστολή των μυών. [21].

Υπομονάδες της PhK.

Οι α και β υπομονάδες είναι μεγάλες πρωτεΐνες που μαζί αποτελούν περίπου το 80% του ολοενζύμου. Είναι ομόλογες ως προς την αλληλουχία τους, στοιχείο που δείχνει ότι πιθανόν να προέρχονται από κοινό προγονικό γονίδιο. Μαζί αναστέλλουν την καταλυτική δράση της γ υπομονάδας. Η α υπομονάδα διαθέτει 1230 αμινοξέα και μοριακό βάρος 134.8 kDa και η β υπομονάδα διαθέτει 1111 αμινοξέα και μοριακό

βάρος 125,2 KDa. Τόσο η α όσο και η β υπομονάδα διαθέτουν περιοχές (που δεν ταυτίζονται) που μπορούν να φωσφορυλιωθούν. Η φωσφορυλίωση ή αυτοφωσφορυλίωση (*in vitro*) των περιοχών αυτών οδηγεί σε ενεργοποίηση της ΡhK. Και οι δύο υπομονάδες διαθέτουν διαφορετικές ισομορφές που εντοπίζονται σε διαφορετικούς ιστούς όπως οι μύες, το ήπαρ και ο εγκέφαλος). Ακόμη οι δύο αυτές υπομονάδες διαθέτουν μια αλληλουχία πολύ-ισοπρενυλίωσης στο C-τελικό τους άκρο ενώ είναι και φαρνεσυλιωμένες. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει η φαρνεσυλίωση δεν έχει εξηγηθεί ακόμα. Έχει όμως βρεθεί ότι η φαρνεσυλίωση γενικά συμμετέχει στην πρόσδεση πρωτεϊνών σε μεμβράνες, οπότε ενδέχεται η ΡhK να ελέγχει με αυτόν τον τρόπο την τοποθέτησή της μέσα στο κύτταρο. Μπορεί ακόμη η φαρνεσυλίωση να βελτιώνει τον τρόπο σύνδεσης της α και β υπομονάδας ή να διευκολύνει την πρόσδεση της ΡhK σε άλλες πρωτεΐνες.[19]

Η υπομονάδα δ έχει δράση καλμοδουλίνης. Είναι η μικρότερη και η μόνη υπομονάδα που διαθέτει μόνο μία ισομορφή. Διαθέτει 148 αμινοξέα και μοριακό βάρος 17,7 KDa. Η καλμοδουλίνη έχει κωδωνοειδές σχήμα και αποτελείται από μια κεντρική α -έλικα, που ενώνει δύο σφαιρικές περιοχές σύνδεσης του Ca^{2+} . Γενικά ένα μόριο καλμοδουλίνης συνδέεται σε πρωτεΐνες και τις ενεργοποιεί ή τις απενεργοποιεί έπειτα από σύνδεση με ιόντα ασβεστίου και στη συνέχεια αποσυνδέεται από αυτές όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου μειωθεί. Δεν ισχύει το ίδιο όμως και με τη δ υπομονάδα της ΡhK που παραμένει συνδεδεμένη στο ολοένζυμο ακόμη και μετά τη μείωση του ασβεστίου. [19]

Η πρόσδεση Ca^{2+} στην υπομονάδα αυτή συνδέει τη συστολή των μυών με την παραγωγή ενέργειας. Ειδικότερα από τη σύσπαση του μυός απελευθερώνεται Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Ακολούθως, όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} φτάσει σε υψηλά επίπεδα (της τάξης του 10^{-6}M), το ασβέστιο προσδένεται στην δ υπομονάδα προκαλώντας την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ΡhK. Η δ υπομονάδα συνδέεται στενά με τη γ υπομονάδα στο C τελικό της άκρο (σε δύο συγκεκριμένες αλληλουχίες). Με την μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στα μυϊκά κύτταρα η δ υπομονάδα σταματά να ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα, αφού πλέον το ασβέστιο δεν συνδέεται πάνω της. [19]

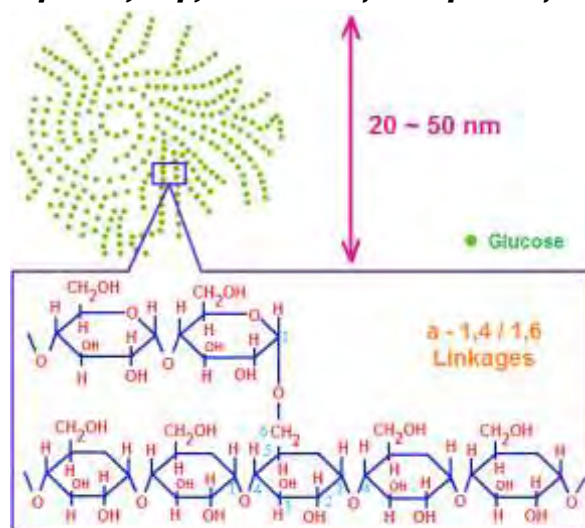
Η γ υπομονάδα είναι η καταλυτική. Διαθέτει 386 αμινοξέα και μοριακό βάρος 44,7 KDa. Αποτελείται από μια περιοχή με δράση κινάσης (σερίνης - θρεονίνης) που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-298) και μια ρυθμιστική περιοχή στο C-τελικό άκρο. Η περιοχή αυτή διαθέτει δύο περιοχές αλληλεπίδρασης με καλμοδουλίνη (αμινοξέα 301-327 και 342-367) και άρα αποτελεί την κύρια περιοχή πρόσδεσης με την δ υπομονάδα. Το τμήμα με δράση κινάσης είναι λειτουργικά ενεργό ακόμα και σε περίπτωση αποκοπής του από την υπόλοιπη πρωτεΐνη. Μάλιστα η καταλυτική του ικανότητα αυξάνεται όταν είναι αποκομμένο. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999). Ωστόσο δεν καθίσταται δυνατή η ρύθμισή του μέσω φωσφορυλίωσης ή μέσω ασβεστίου σε αντίθεση με το ολοένζυμο και αυτό διότι απουσιάζουν οι περιοχές οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν και οι δύο περιοχές σύνδεσης με την δ υπομονάδα οι οποίες

εντοπίζονται στο C- τελικό άκρο [6]. Οι δύο ισομορφές της (PhKg1 και PhKg2) εντοπίζονται στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ αντίστοιχα.

Υποκυτταρικός Εντοπισμός

Μελέτες στην εγκεφαλική ισομορφή του ενζύμου της PhK από εγκεφαλικό ιστό αρουραίων κατέδειξαν ότι η PhK εντοπίζεται σε αρκετά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Έτσι σημαντικές συγκεντρώσεις του ενζύμου φαίνεται να υπάρχουν στα μιτοχόνδρια αλλά και στις μεμβράνες. Μάλιστα στα μιτοχόνδρια η κίνηση εντοπίζεται τόσο στο διαμεμβρανικό χώρο όσο και στις μεμβράνες. Κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να συμβαίνει όμως σε άλλους ιστούς, με εξαίρεση την ύπαρξη μικρής ενζυμικής δραστηριότητας στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Η ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας στα συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα προτείνει την πιθανή ύπαρξη διαφορετικών μορφών της εγκεφαλικής ισομορφής της PhK. [22]

Ο ρόλος της PhK στο μεταβολισμό του γλυκογόνου



Εικόνα 1 Δομή γλυκογόνου (Biology Discussion.com)

Το γλυκογόνο, που ανήκει στην κατηγορία των πολυσακχαριτών, είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει ενέργεια όταν αυτό απαιτείται.

Οι μονάδες α-D γλυκόζης, από τις οποίες αποτελείται το μόριο του γλυκογόνου, συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και σχηματίζουν μεγάλου μήκους αλυσίδες που διακλαδίζονται με τον σχηματισμό α-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών. Ο μεγάλος αριθμός των διακλαδώσεων έχει βαρύνουσα σημασία στη φυσιολογία των θηλαστικών, διότι με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται πολλά ελεύθερα άκρα, στα οποία προσκολλώνται τα πλεονάζοντα μόρια της γλυκόζης που αποθηκεύεται προσωρινά και από τα οποία μπορεί να αρχίσει ταυτόχρονα η απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης, όταν οι ανάγκες του οργανισμού το απαιτούν. Η δημιουργία του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω μιας πρωτεΐνης, της γλυκογενίνης, η οποία «συνδέει» τα

πρώτα μόρια γλυκόζης και στη συνέχεια άλλα ένζυμα αναλαμβάνουν την επιμήκυνση του μορίου. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στο κέντρο των σφαιριδίων γλυκογόνου.[5]

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μυς ωστόσο ανιχνεύεται και σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, ο νεφρός, ο λιπώδης ιστός και τα ερυθροκύτταρα, αλλά ο ρόλος του στους ιστούς αυτούς παραμένει κατά κύριο λόγο ακόμη άγνωστος. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι μεγαλύτερη στο ήπαρ παρά στους μυς (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μυς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κόκκων διαμέτρου 100 έως 400 Å που περιέχουν τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Ο σημαντικός ρόλος της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ, φαίνεται από τα παρακάτω:

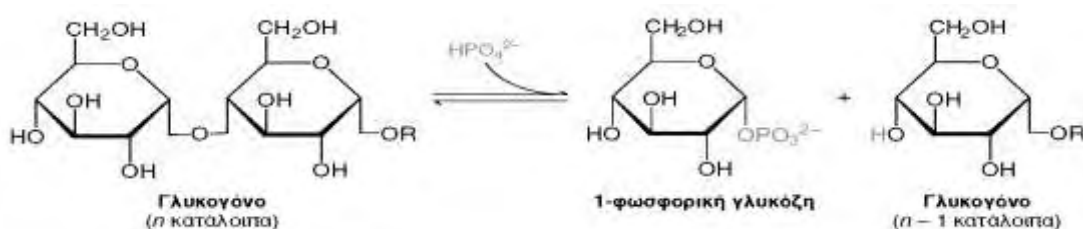
1. ρυθμίζεται το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα και δημιουργείται μια «δεξαμενή» γλυκόζης για συνεχή μυϊκή δραστηριότητα
2. τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση γίνονται από διαφορετικές μεταβολικές οδούς πράγμα που αποδεικνύει μια σπουδαία βιοχημική αρχή
3. η ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου γίνεται με μηχανισμούς γενικότερης σημασίας

Κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου αποδίδονται μόρια γλυκόζης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) ελέγχεται από δύο ορμόνες, τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Και οι δύο ορμόνες επηρεάζουν τη δραστηριότητα δύο ενζύμων, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, το οποίο συμμετέχει στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενεργοποιείται, και της συνθάσης του γλυκογόνου, που συμμετέχει στη σύνθεση του γλυκογόνου και απενεργοποιείται. Αντίθετα, η σύνθεση του γλυκογόνου (γλυκονεογένεση) διεγείρεται από την ινσουλίνη.[5]

Η ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη ανάμεσα στα γεύματα αυξάνεται λόγω του ελεγχόμενου μεταβολισμού του γλυκογόνου. Επομένως, η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα οφείλεται στο γλυκογόνο. Ο ρόλος του αυτός του έχει βαρύνουσα σημασία, επειδή το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος είναι η γλυκόζη, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης ασιτίας. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως αποτελεί μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες αποτελούν τις βασικές αποθήκες του γλυκογόνου. Εκεί εντοπίζεται στο κυττοσόλιο σε μορφή κοκκίων (glycogen particles). Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μυς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ ρυθμίζονται ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της

γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές αποσκοπούν μόνο στην κάλυψη των αναγκών των μυών. Διάφορα ένζυμα λαμβάνουν μέρος στον καταβολισμό του γλυκογόνου, όμως το πιο καθοριστικό από αυτά είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) που καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και διατηρείται η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα. Η GP μπορεί να βρίσκεται στην ενεργό μορφή α (GPα) και τη μη ενεργό μορφή β (GPβ). Η αλληλομετατροπή μεταξύ των δύο αυτών διαμορφώσεων γίνεται με φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) φωσφορυλιώνει την ανενεργό φωσφορυλάση β (GPβ) και τη μετατρέπει σε ενεργό φωσφορυλάση α (GPα). (Εικόνα 2). Στους μύς η μορφή β της φωσφορυλάσης ενεργοποιείται από το AMP ενώ στο ήπαρ η γλυκόζη αναστέλλει τη μορφή α. [5].

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη ([5]).

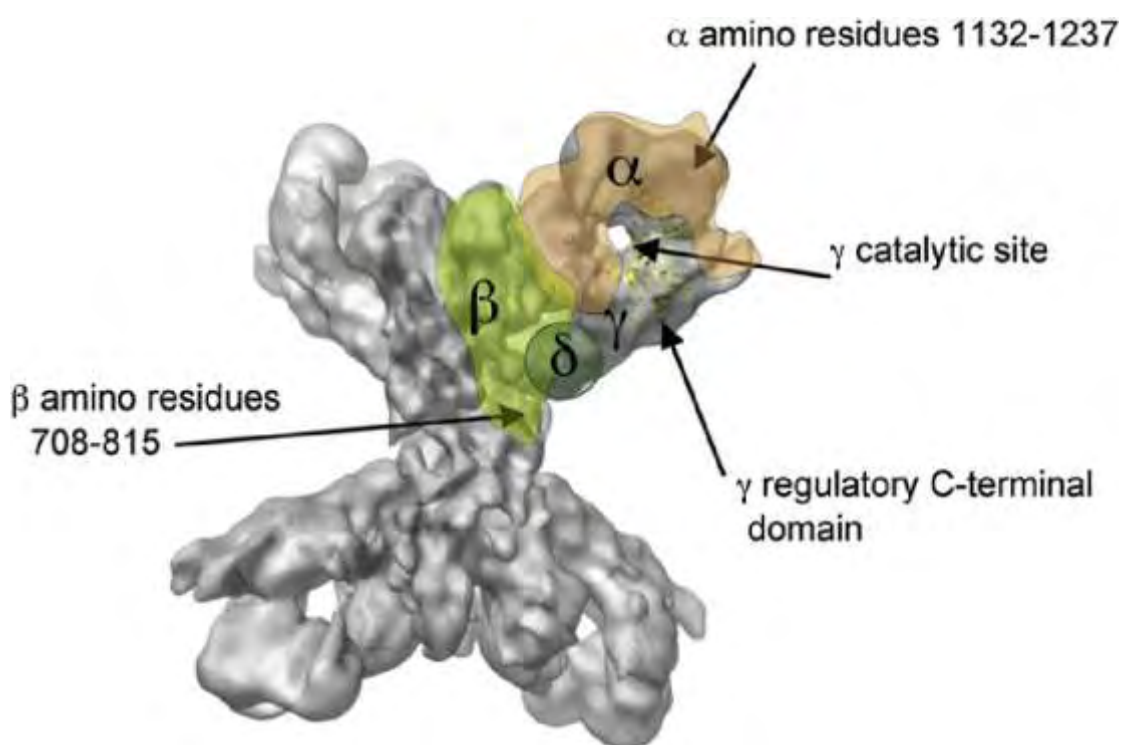


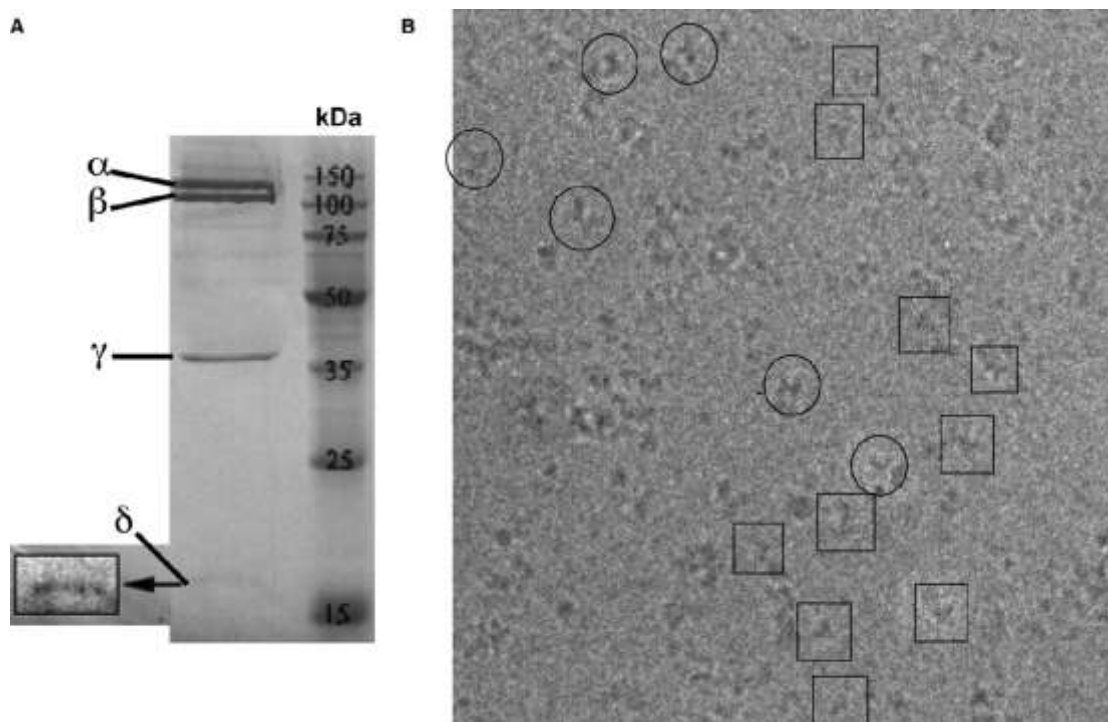
Εικόνα 3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου [5]

Οι διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου, που εντοπίζονται στους μύς και στο ήπαρ, δείχνουν τις διαφορετικές πορείες που μπορεί να ακολουθήσει το κύριο προϊόν της γλυκογονόλυσης, δηλαδή η 1-φωσφορική γλυκόζη.

Δομή

Η ΡhΚ είναι μια από τις μεγαλύτερες πρωτεϊνικές κινάσες με περίπλοκη δομή. Το μοριακό της βάρος έχει υπολογιστεί στα $1,3 \times 10^6$ Da. Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Οι υπομονάδες α , β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα. [19]. Όπως προκύπτει από μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας (εικόνα 5) στην ΡhΚ του κουνελιού με ανάλυση $9,9\text{\AA}$ το ολοένζυμο έχει σχήμα πεταλούδας, με δύο λοβούς (σε σχήμα φτερών) που συνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια δύο δομών που θυμίζουν «λοξές γέφυρες». Οι διαστάσεις ολόκληρου του ενζύμου είναι $270 \times 225 \times 160 \text{\AA}$. Οι διαστάσεις των λοβών έχουν υπολογιστεί στα $225\text{\AA} \times 110\text{\AA}$ και οι γέφυρες έχουν μήκος 55\AA και πλάτος 45\AA . Εκτός από τη δομή πεταλούδας, όμως, οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποκαλύψει και την ύπαρξη άλλων στερεοδιαμορφώσεων [20]. Μελέτες ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας και σταυροσυνδέσεων συνέβαλαν στην αναγνώριση των πιθανών θέσεων των επιμέρους υπομονάδων. Η υπομονάδα α είναι πιθανό βρίσκεται στο εξωτερικό άνω τμήμα των λοβών. Το N-τελικό της άκρο αλληλεπιδρά με τη β υπομονάδα, ενώ το C-τελικό της με τη γ υπομονάδα. Η β υπομονάδα εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα των λοβών και αλληλεπιδρά με την α και τη γ υπομονάδα. Η γ υπομονάδα βρίσκεται στο εσωτερικό των λοβών όπως επαληθεύτηκε από σύνδεση ειδικών αντισωμάτων. Όπως αναφέρθηκε αλληλεπιδρά με την α υπομονάδα ενώ το C-τελικό της άκρο φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη δ υπομονάδα, η οποία εντοπίζεται κοντά στη γέφυρα. [23]





Εικόνα 5 Α) Ηλεκτροφόρηση PhK σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE

Β) Κρυο-ηλεκτρονική μικρογραφία της PhK. Η χαρακτηριστική μορφή πεταλούδας επισημαίνεται με κύκλο, ενώ οι λοιπές διαμορφώσεις με τετράγωνο [20]

Καταλυτικός Μηχανισμός

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα για την PhK ([24, 25]) και άλλες κινάσες συμφωνούν με τον μηχανισμό ευθύγραμμης μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας όπως περιγράφεται ([26] [27]). Συνοπτικά, ο μηχανισμός μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας μπορεί να θεωρηθεί περίπτωση οξεοβασικής κατάλυσης.

Συνδυασμός κινητικών μελετών και μελετών σε διαλύματα διαφορετικού ιζώδους έδειξαν ότι η PhKγtrc, όπως και η PKA, παρουσιάζουν έναν μηχανισμό δύο χημικών βημάτων. Στο πρώτο βήμα που είναι το γρήγορο γίνεται η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας, ενώ στο δεύτερο που είναι το αργό βήμα γίνεται η απελευθέρωση των προϊόντων.

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι κινητικές παράμετροι της PhKγtrc όταν αυτή συνδέεται με το ATP ή με την GPb.

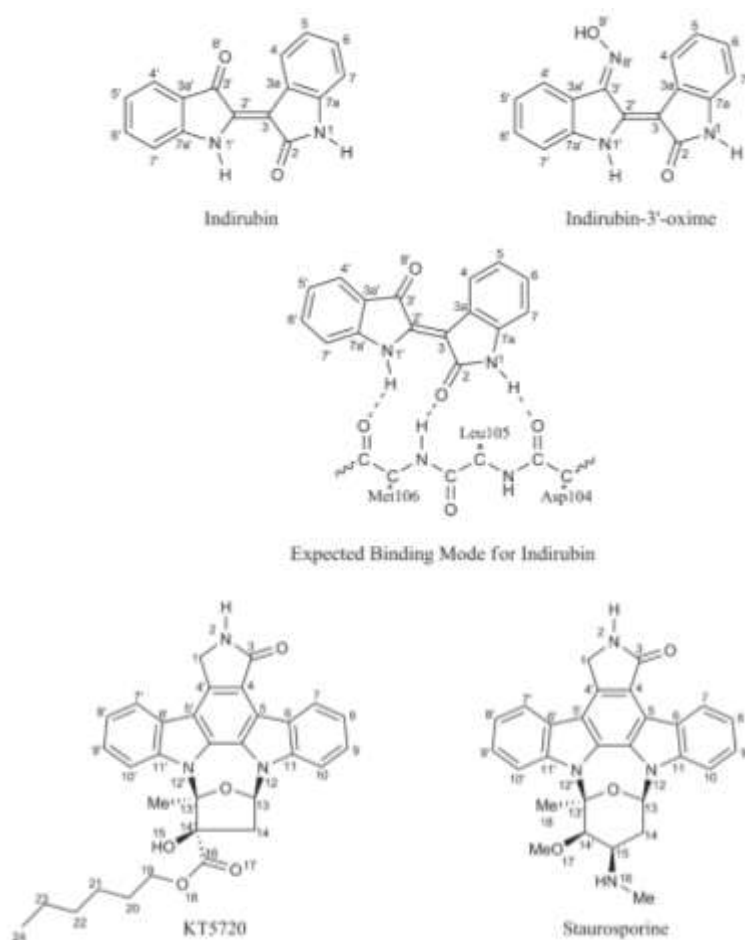
Πίνακας 1 Κινητικές Παράμετροι της PhKγtrc

Ενζυμικός τύπος	Ως προς μεταβλητή [GPb]			Ως προς μεταβλητή [ATP]		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)

Η ΡhK ως μοριακός φαρμακευτικός στόχος

Μελέτες κυτταρικών και ζωικών μοντέλων έδειξαν ότι η κινάση συμμετέχει σε μια ποικιλία διαφορετικών μονοπατιών. Συνεπώς αποτελεί πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο.

Αρχικά η αναστολή της ΡhK οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της GPa ευνοώντας τη γλυκογονική σύνθεση. Έτσι, η ΡhK αφήνει πολλές υποσχέσεις για δημιουργία αντιγλυκαιμικών φαρμάκων στο προσεχές μέλλον. Πρόσφατα μελετήθηκε η σύνδεση συγκεκριμένων αναστολέων στην ΡhK. Οι αναστολείς που μελετήθηκαν ήταν ανάλογα σταυροσπορίνης και ινδιρουβίδης. Από αυτούς ο εξειδικευμένος αναστολέας KT5720 και ο αναστολέας indirubin-3'-oxime αποτελούσαν τους πιο ισχυρούς αναστολείς της [2].



Εικόνα 5 Δομές της Ινδιρουβίνης και της σταυροσποτίνης καθώς και των αντίστοιχων αναστολέων τους indirubin-3'-oxime και KT5720 [28]

Επιπροσθέτως, η γλυκογονίαση ΙΧ συγκαταλέγεται στις σπάνιες μεταβολικές νόσους (1 άτομο ανά 100.000) και οφείλεται σε ανεπάρκεια της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK). Με βάση ιστολογικές παρατηρήσεις, εξαιτίας της ανεπάρκειας της PhK γίνεται παθολογική συσσώρευση γλυκογόνου στους ιστούς (ασθένεια εναπόθεσης γλυκογόνου). Ισομορφές των υπομονάδων της PhK εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και οι δύο τύποι της νόσου οφείλονται σε μεταλλάξεις της ηπατικής ή της μυϊκής ισομορφής του ενζύμου αντίστοιχα και διαφέρουν ως προς την ηλικία εμφάνισης της νόσου και τα συμπτώματα. Μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA1 που κωδικοποιεί την μυϊκή α υπομονάδα ευθύνονται για την ανεπάρκεια της μυϊκής PhK ενώ αντίστοιχα μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA2 ευθύνονται για την πιο κοινή φυλοσύνδετη ανεπάρκεια της ηπατικής PhK (φυλοσύνδετη ηπατική γλυκογονίαση XLG)[29]

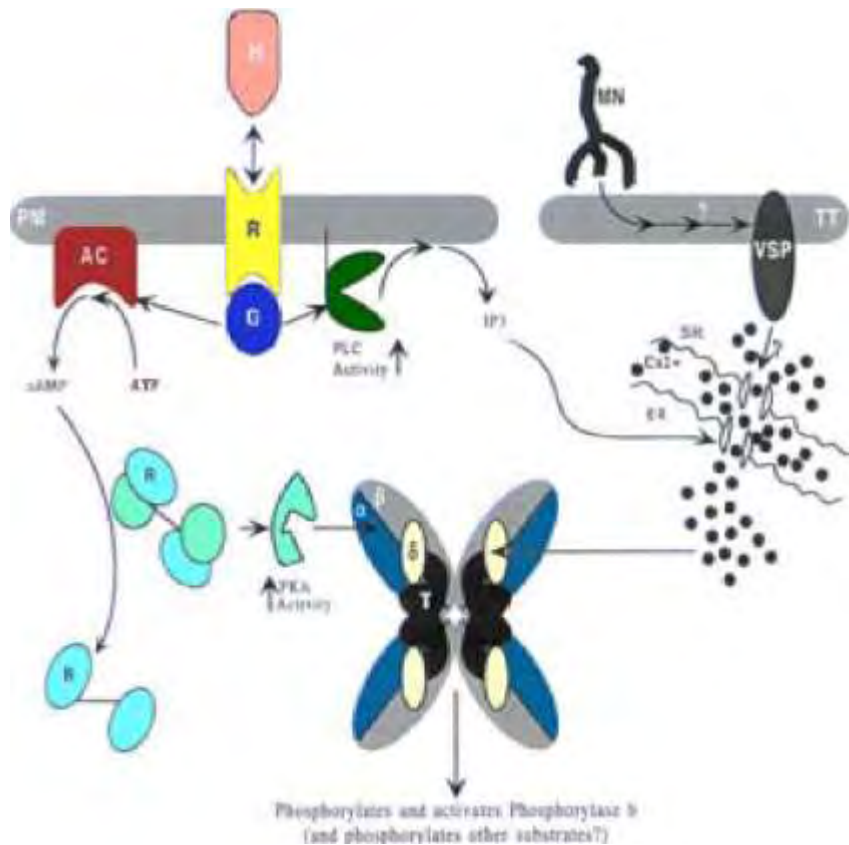
Τα τελευταία χρόνια και πάντα προς την κατεύθυνση της αξιοποίησης της PhK ως φαρμακευτικού στόχου αναδείχθηκαν νέες ιδέες. Σε επίπεδο πειραματικών μελετών αναδείχθηκε ότι η γονιδιακή υπερέκφραση της PhK σχετίζεται με παθολογική αγγειογένεση και ανάπτυξη όγκων, ενώ μελέτες σάρωσης αναστολέων υψηλής απόδοσης σε *in vivo* σύστημα zebrafish και *in vitro* μοντέλων αγγειογένεσης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση νέων αναστολέων της PhK με αντι-αγγειογενετική δράση με υποσχόμενα μέχρι στιγμής αποτελέσματα. [3]

Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας

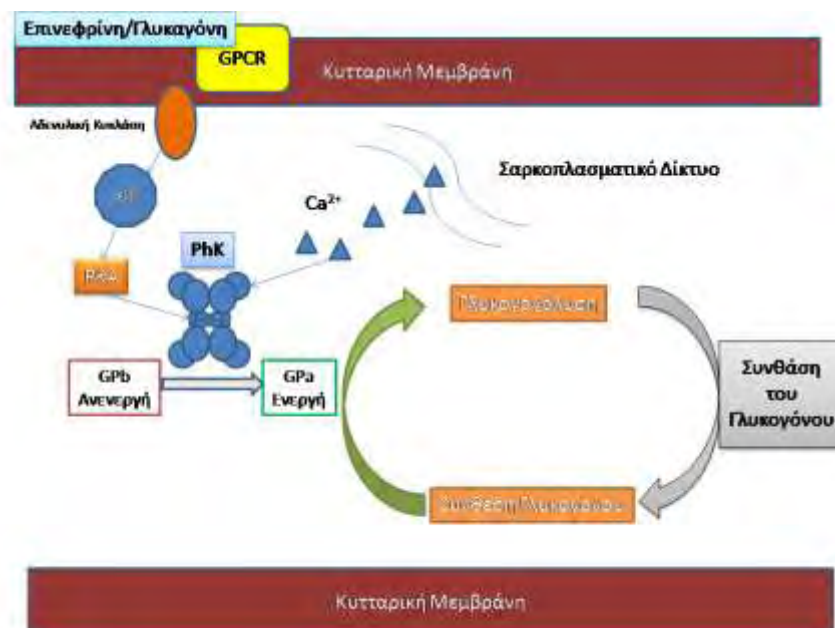
Μηχανισμοί ρύθμισης της PhK

Η Phk φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Όπως φαίνεται και στις εικόνες 7 και 8 η PKA ενεργοποιείται μέσω του καταρράκτη του κυκλικού AMP (cAMP). Ορισμένες ορμόνες (όπως η αδρεναλίνη που συνδέεται σε β-αδρενεργικούς υποδοχείς στους περισσότερους ιστούς και η γλυκαγόνη στο ήπαρ) προκαλούν την ταχεία αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα το cAMP είναι ένα ενδοκυτταρικό κυκλικό νουκλεοτίδιο τα επίπεδα του οποίου ρυθμίζονται από την ισορροπία μεταξύ της δράσης δύο ενζύμων: της αδενυλικής κυκλάσης (AC) που καταλύει την παραγωγή του από το ATP και μιας φωσφοδιεστεράσης (PDE) η οποία το διασπά. Η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης διεγείρεται ύστερα από αλληλεπίδραση με G πρωτεΐνες ή διάφορα είδη φωσφοδιεστεράσης. Οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες διασπώνται σε α υπομονάδα και στο σύμπλοκο βγ το οποίο και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Κύριος στόχος του cAMP είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA ή αλλιώς εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση ή cAPK) η οποία ενεργοποιείται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την PhK. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει αρχικά σε τέσσερις περιοχές της β υπομονάδας, αυξάνοντας έτσι την εξειδίκευση της κινάσης. Φωσφορυλίωση συμβαίνει παράλληλα και στη α υπομονάδα (σε 7 περιοχές) προς ενίσχυση του αποτελέσματος της φωσφορυλίωσης της β υπομονάδας, όμως η φωσφορυλίωση της α από μόνη της δεν οδηγεί στην ενεργοποίηση της Phk. Αφού η PKA φωσφορυλιώνει και

την α και τη β υπομονάδα κι επειδή υπάρχουν τέσσερις από κάθε υπομονάδα στο ολοένζυμο, είναι πιθανόν να δημιουργούνται πολλά φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα (ανάλογα με τον αριθμό των υπομονάδων που φωσφορυλιώνονται) στον καταρράκτη ενεργοποίησης από το cAMP. Συνεπώς η φωσφορυλίωση δεν αποτελεί έναν απλό διακόπτη on/off αλλά έναν πολύπλοκο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης και της εξειδίκευσης του ολοενζύμου σε πολλά στάδια. [5, 19]



Εικόνα 7 Μονοπάτια ενεργοποίησης της PhK [19]



Εικόνα 8 PhK και μεταβολισμός του γλυκογόνου. Ορμονικά ερεθίσματα προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς (GPCR) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες (αδενυλική κυκλάση). Η PKA ενεργοποιείται από το cAMP και στη συνέχεια ενεργοποιεί την PhK με φωσφορυλίωση. Η PhK ενεργοποιεί στη συνέχεια την φωσφορυλάση του γλυκογόνου φωσφορυλιώνοντάς την.

Ασβέστιο και αυτοαναστολή

Η δράση της Phk είναι ασβεστοεξαρτώμενη. Η φωσφολιπάση C είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί από ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃), η οποία στη συνέχεια συνδέεται στους ειδικούς υποδοχείς της στο ενδοπλασματικό και το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Ακόμη στα μυϊκά κύτταρα η εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε ενεργοποίηση του υποδοχέα της διυδροπυριδίνης (DHPR) που συνδέεται μηχανικά με τον υποδοχέα της ρυανοδίνης, απελευθερώνοντας ιόντα Ca στο κυτταρόπλασμα [30, 31]. Η υπομονάδα που ελέγχει τη ρύθμιση μέσω ασβεστίου είναι η δ, που έχει δράση καλμοδουλίνης. Έχει προταθεί ότι το C τελικό άκρο της γ υπομονάδας (η περιοχή που συνδέεται με τη δ υπομονάδα) περιλαμβάνει έναν ασβεστοεξαρτώμενο μοριακό διακόπτη. Όταν ο διακόπτης αυτός βρίσκεται στην κατάσταση off (απουσία Ca²⁺) η περιοχή αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται η προσέγγιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αντίθετα παρουσία Ca²⁺ η δ υπομονάδα συνδέεται στο C τελικό άκρο της γ υπομονάδας μεταβάλλοντας την κατάσταση από off σε on και επιτρέποντας στην καταλυτική υπομονάδα να προσεγγίσει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. [19]

Η ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της σύνδεσής του στις υπομονάδες α και β, κάτι τέτοιο όμως μένει να διευκρινιστεί.

Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η σύνδεση Ca²⁺ ενεργοποιούν μόνο μερικώς την PhK. Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου όμως επιτυγχάνεται με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της β υπομονάδας και σύνδεσης Ca²⁺ στη δ υπομονάδα.

Απενεργοποίηση της PhK

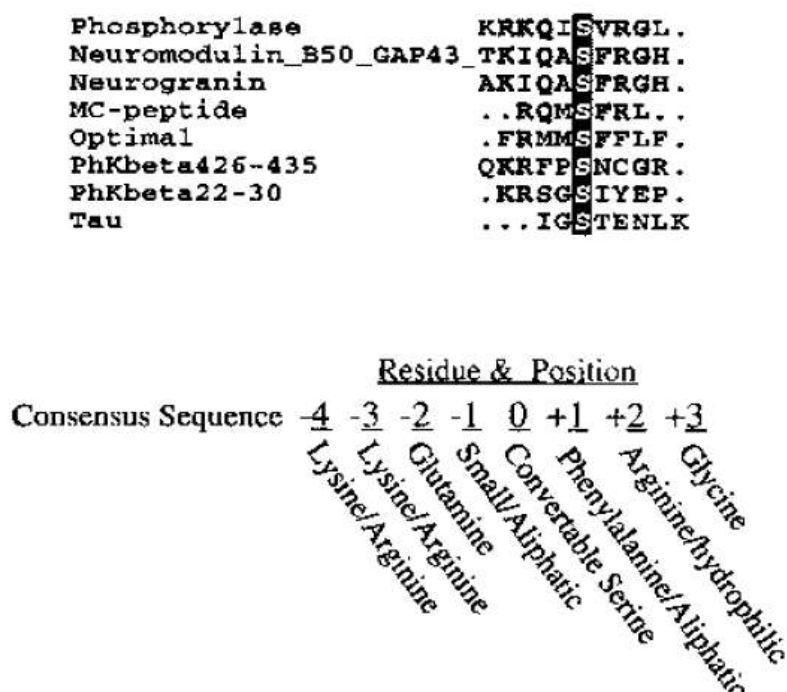
Η μεταβολική «μετατόπιση» από την γλυκογενόλυση στη σύνθεση του γλυκογόνου επιτυγχάνεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της PhK, της GPα και της συνθάσης του γλυκογόνου από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1). Σε ότι αφορά την PhK, η απενεργοποίησή της επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της PKA. Όπως είδαμε η PKA ενεργοποιεί την PhK φωσφορυλιώνοντάς την στην υπομονάδα β. Η PKA μπορεί όμως να προσθέσει μια επιπλέον φωσφορική ομάδα στην υπομονάδα α. Έτσι η PhK γίνεται καλύτερο υπόστρωμα για την αποφωσφορυλίωση και την επακόλουθη απενεργοποίηση από το ένζυμο PP1. Η PP1 απομακρύνει επίσης τη φωσφορική ομάδα από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, μετατρέποντας το ένζυμο στη συνήθως ανενεργό μορφή b. Η φωσφορυλίωση των υπομονάδων α γίνεται αργά. Έτσι παρατείνεται η αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Είναι αδύνατη η απενεργοποίηση της κινάσης πριν από την ολοκλήρωση της φωσφορυλίωσης των υπομονάδων α. Η αργή

φωσφορυλίωση των υπομονάδων α διασφαλίζει ότι η κινάση και επακόλουθα η φωσφορυλάση παραμένουν ενεργές για μεγάλο διάστημα.) [5]

Επομένως η ρύθμιση της δραστηριότητας της PhK γίνεται με τους παραπάνω τρόπους ή με συνδυασμό τους. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι το pH επιδρά σημαντικά στην δράση του ενζύμου *in vitro* (η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται όταν το pH μεταβαίνει από 6,8 προς 8,2) [19]

Αναγνώριση υποστρωμάτων

Η PhK αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία πάνω στην GPb πάνω στην οποία προσδέεται ώστε να φωσφορυλιώσει το κατάλοιπο σερίνης 14. Η αλληλουχία αυτή φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 9 Αλληλουχία αναγνώρισης από την PhK. Η αλληλουχία αυτή εντοπίζεται και σε άλλες πρωτεΐνες (επάνω). Τα αμινοξέα που την αποτελούν φαίνονται κάτω.

Το MC-πεπτίδιο διαθέτει μια αλληλουχία αμινοξέων που καθιστούν ισχυρότερη τη σύνδεση της PhK σε αυτό. Η PhK έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το MC-πεπτίδιο ($K_m = 400 \mu M$) σε σχέση με το φυσικό πεπτίδιο (NS: Ac-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-Gly) ($K_m = 1800 \mu M$) που η αμινοξική του αλληλουχία αντιστοιχεί σε αυτή της GPb (αμινοξέα 11-17). Και τα δύο πεπτιδικά υποστρώματα έχουν περίπου 50 φορές μεγαλύτερη K_m σε σχέση με την GPb.

Το μοντέλο Michaelis-Menten και οι κινητικές ιδιότητες των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, στις οποίες η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζεται γενετικά. Τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων, που ονομάζονται υποστρώματα. Ως *καταλύτης* ορίζεται κάθε ένωση που επηρεάζει την ταχύτητα διεξαγωγής μίας χημικής αντίδρασης, χωρίς να εμφανίζεται στα τελικά της προϊόντα. Ο καταλύτης παραμένει αμετάβλητος στη μάζα μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Οι καταλύτες που παράγονται και χρησιμοποιούνται από τους ζωντανούς οργανισμούς είναι οργανικής φύσης και ονομάζονται ένζυμα. [5] Οι αντιδράσεις τις οποίες καταλύουν τα ένζυμα είναι οι θερμοδυναμικά ευνοούμενες (αυτές που συνοδεύονται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας). Με τη δράση του ενζύμου σχηματίζεται ένα σύνθετο μόριο (σύμπλοκο) μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος ή υποστρωμάτων. Το σύνθετο αυτό μόριο στη συνέχεια διασπάται και παράγεται το προϊόν της αντίδρασης και το αμετάβλητο ένζυμο. Τα σύμπλοκα σχηματίζονται μεταξύ υποστρώματος και λίγων περιοχών της επιφάνειας του ενζύμου. Η περιοχή του ενζύμου στην οποία συνδέεται το υπόστρωμα, προκειμένου να υποστεί τροποποίηση, ονομάζεται *ενεργό κέντρο ή ενεργός περιοχή*. [5, 32]

Σε ένα σύστημα όπου υπάρχει περίσσεια ενζύμου και η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή, η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται με κάθε αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένα ένζυμο συνήθως εκφράζεται με τη σταθερά K_m των *Michaelis-Menten*. Η σταθερά αυτή ορίζεται ως η μοριακή συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την οποία το 50% των ενεργών κέντρων του ενζύμου καταλαμβάνεται από το υπόστρωμα και ο ρυθμός της αντίδρασης είναι το μισό του μέγιστου. Εκτός της τιμής K_m , η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αντίδραση μειώνεται, καθώς προσεγγίζει το μέγιστο της συγκέντρωσης. [5] Για συγκεντρώσεις υποστρώματος μικρότερες του K_m ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται με κάθε αύξηση στη συγκέντρωση. Όταν οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερες από το K_m του ενζύμου, τότε το υπόστρωμα παύει πλέον να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα στη συγκεκριμένη μεταβολική διαδικασία. [32, 33]

Το μοντέλο *Michaelis-Menten* δίνει πληροφορίες για τις κινητικές ιδιότητες μερικών ενζύμων. Στο μοντέλο αυτό, ένα ένζυμο (E) συνδυάζεται με ένα υπόστρωμα (S) για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), το οποίο μπορεί να σχηματίσει ένα προϊόν (P) ή να διασπαστεί σε E και σε S. [32]

Η σταθερά Michaelis-Menten, K_m , και η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , απορρέουν άμεσα από τις ταχύτητες της κατάλυσης που μετρώνται σε μια ποικιλία συγκεντρώσεων του

υποστρώματος. Ο προσδιορισμός της K_m και της V_{max} συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων προσομοίωσης δεδομένων με τη χρήση υπολογιστή. Η τιμή της K_m για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Έτσι, η K_m παρέχει ένα μέτρο της συγκέντρωσης του υποστρώματος που χρειάζεται για την πραγματοποίηση μιας σημαντικής κατάλυσης.[5]

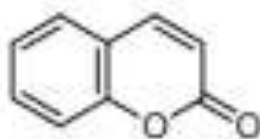
Αναστολείς της PhK

Ανάλογα Ινδιρουβίνης και Σταυροσπορίνης

Τα ανάλογα ινδιρουβίνης είναι φυσικά bis-ινδόλια που εντοπίζονται σε φυτά και μαλάκια ενώ αξιόλογη είναι η δράση τους κατά της λευχαιμίας, του διαβήτη τύπου II και κάποιων νευρολογικών ασθενειών, όπως το Alzheimer. Θεωρείται ότι η δράση τους αυτή οφείλεται στην πρόσδεση των αναλόγων αυτών στην θέση πρόσδεσης του ATP στις κινάσες, γεγονός που τις αναστέλλει.[28]. Η σταυροσπορίνη είναι επίσης φυσικό προϊόν που απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus* και παρουσιάζει ανασταλτική δράση απέναντι σε πληθώρα κινασών. Σε ό,τι αφορά την PhK οι δύο αυτοί αναστολείς καθώς και τα ανάλογά τους (Indirubin-3-oxime και KT5720 αντίστοιχα) μελετήθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση όσο και ως προς την εξειδίκευσή τους. Εκτός από την ινδιρουβίνη, οι υπόλοιποι αναστολείς παρουσίαζαν υψηλή αναστολή απέναντι στην κινάση (της τάξης των nM) μόνο ο KT5720 παρουσίασε υψηλή εξειδίκευση ως προς την κινάση.[28]

Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι οργανικές ενώσεις που προέρχονται από φυτά, βακτήρια και μύκητες και απαντώνται στα περισσότερα μέρη ενός φυτού. Αρχικά θεωρούνταν παράγωγα του βενζοϊκού οξέος αλλά πλέον κατατάσσονται στις ετεροκυκλικές ενώσεις με οξυγόνο.[34] Χαρακτηρίζονται από δομική ποικιλομορφία και έχουν πληθώρα φαρμακευτικών εφαρμογών. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνται ως αντυπηκτικό επειδή η δομή τους μοιάζει με αυτή της βιταμίνης Κ. Παράλληλα έχουν παραχθεί πολλές συνθετικές κουμαρίνες που στοχεύουν κινάσες αναστέλλοντας τη δράση τους.[4] Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά ανάλογα της κουμαρίνης.



Εικόνα 6 Βασική δομή κουμαρίνης

Σκοπός

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν στόχο πολλών φαρμάκων. Μελέτες σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα έχουν προσδιορίσει τη ΡhK ως νέο θεραπευτικό στόχο τόσο για τον διαβήτη τύπου 2 όσο και για τον καρκίνο. Οι περισσότεροι αναστολείς κινασών δρουν συναγωνιστικά ως προς το ATP. Η σύνδεσή τους γίνεται στο κέντρο πρόσδεσης του ATP το οποίο παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στις κινάσες. Οι κουμαρίνες αναστέλλουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες-στόχους και ένζυμα συμπεριλαμβανομένου και σημαντικού αριθμού κινασών.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση μιας σειράς αναλόγων κουμαρίνης ώστε να ελεγχθεί η ανασταλτική τους ικανότητα. Αυτό περιλάμβανε αρχικά την κινητική σάρωση με στόχο να βρεθούν οι βέλτιστοι αναστολείς. Στη συνέχεια, ακολούθησε *in silico* δομικός χαρακτηρισμός της σύνδεσης των αναστολέων αυτών στην ΡhK.

Υλικά – Μέθοδοι

Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
Ampicillin	Serva
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂)	Merck
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Applichem

Magnesium Chloride anhydrous (MgCl ₂)	Alfa Aesar
Manganese (II) Chloride (MnCl ₂)	Sigma
Methanol	Scharleu
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Scharleu
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH	Merck
PMSF	AppliChem
Potassium chloride (KCl)	Merck
Pyridoxine	Sigma
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Tryptone	Serva
Yeast extract	Serva

Όργανα

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

Κύτταρα-Πλασμίδια

Κύτταρα	Εταιρεία
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies
E. coli B834 Plyss	

Πλασμίδια	Εταιρεία
hIGP → pDEST-14	Invitrogen
rmPhK-γ-trnc → pGEX-6p-1	GE HealthCare

Στήλες

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

Αναστολείς

Οι αναστολείς δόθηκαν από τον Prof. Goutam Brahmachari, Visva Bharati University, India

Μεθοδολογία

Παρασκευαστικές Μέθοδοι

Υπερέκφραση και καθαρισμός μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmPhK)

Το γονίδιο της μυϊκής γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κόνικλο (*rmPhK-γ-trunc*) έχει κλωνοποιηθεί στον φορέα έκφρασης *pGEX-6-1*. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *E. coli B834 plyss*. Το χαρακτηριστικό αυτού του φορέα είναι ότι δίνει στην πρωτεΐνη μια επικράτεια γλουταθειόνης (*GST*) στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης.

Όλες η διαδικασίες χειρισμού βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε ασηπτικές συνθήκες. Αρχικά, μικρή ποσότητα των κυττάρων που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αναπτύχθηκαν σε 10mL αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth* κατά *Miller (AppliChem)*, στο οποίο προστέθηκαν 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αμπικιλίνη και 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ χλωραμφενικόλη. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα και σε θερμοκρασία 37 °C, 210 rpm για 12 έως 16 ώρες. Κατόπιν 10 mL από τη συγκεκριμένη υγρή καλλιέργεια μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth*, όγκου 1 L (αναλογία 1:100) μέσα σε κωνική φιάλη. Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις σε αντιβιοτικά. Πριν την προσθήκη των κυττάρων, διατηρήσαμε 1 mL σε κυψελίδα από το παραπάνω θρεπτικό-μίγμα ως τυφλό-μάρτυρα με στόχο την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 37 °C, 210 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα (optical density OD) σε μήκος κύματος 600 nm να φτάσει σε τιμή 0.6-0.7. Στη συνέχεια οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι η θερμοκρασία τους να πέσει στους 18 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, *IPTG*, σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχόμενο ανακινούμενο επωαστήρα και σε θερμοκρασία 18 °C, 210 rpm για 12 έως 16 ώρες. Με το πέρας της επώασης με σκοπό την υπερέκφραση οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν ξανά σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (cogex των 250 mL) σε 4225 g, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε το ίζημα.

Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα που περιείχε 50 mM HEPES, 0.2 M NaCl, 0.1 % MTG, 5 % γλυκερόλη (v/v) και 1 mM PMSF, pH 8.2. Το PMSF προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Τα διαλυτοποιημένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο παρουσία βενζονάσης για 20 min. Η βενζονάση είναι μια νουκλεάση. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε ειδική συσκευή σε πάγο με τα εξής χαρακτηριστικά: *amplitude*: 70% για 30 sec, εφαρμογή υπερηχων/30 sec, παύση για 3 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση για 1h:30min, 4 °C, 21130 g που

όταν περατώθηκε έγινε φιλτράρισμα του υπερκειμένου με αποστειρωμένο φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45 μm . Το κυτταρόλυμα αφέθηκε σε πάγο (0 °C).

Ακολούθησε η απομόνωση της *rmPhK- γ -trunc* η οποία έγινε σε 3 στάδια με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC.

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

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 50 mM Tris, 0.2 M NaCl, 0.1 % MTG, 5% glycerol, pH 8.2 (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με τη χρήση του διαλύματος A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με τη χρήση διαλύματος που περιείχε 50 mM Tris, 0.2 M NaCl, 0.1 % (w/v) MTG και 20 mM GSH, pH 8.2 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Επακολούθησε η ανάλυση των κλασμάτων με τη μέθοδο SDS-PAGE τα κλάσματα τα οποία περιείχαν την GST-*rmPhK- γ -trunc* συγκεντρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε προσθήκη της πρωτεάσης 3C σε αναλογία 1 προς 20 με την ποσότητα της πρωτεΐνης με σκοπό την αποκοπή της πρωτεϊνικής ετικέτας συγγένειας. Το πρωτεϊνικό μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία 4 °C, για 12 έως 16 ώρες. Τα παράγωγα της παραπάνω διαδικασίας θα είναι είτε GST-*rmPhK- γ -trunc*, όπου δεν επετεύχθη η τμήση, είτε *rmPhK- γ -trunc* χωρίς ετικέτα συγγένειας GST.

Δεύτερο στάδιο: Στήλη συγγένειας HiTrap Blue sepharose HP (Cibacron Blue F3G-A, GE HeathCare).

Στη συνέχεια έγινε αραίωση του δείγματος με διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris, 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 σε αναλογία 1:4, ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 50 mM. Η διαδικασία αυτή γίνεται διότι η υψηλή συγκέντρωση NaCl θα παρεμπόδιζε την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (flow through). Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με αυτό το διάλυμα και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε σε δύο στάδια με διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris, 2 M NaCl, 0.1 % (v/v) MTG, 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.2 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Αρχικά έγινε έκλουση με 50 % διαλύματος B (1 M NaCl) και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή 100 % διαλύματος B (2 M NaCl). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση με τη μέθοδο SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν και επανατοποθετήθηκαν σε στήλη GST.

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

Τα διαλύματα A και B που χρησιμοποιήσαμε είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την στήλη GST του πρώτου σταδίου. Το πρωτεϊνικό διάλυμα από το δεύτερο βήμα επανατοποθετήθηκε σε στήλη βαρύτητας η οποία περιέχει σφαιρίδια προσροφημένης γλουταθειόνης που είχαν εξισορροπηθεί με το διάλυμα A. Η *rmPhK- γ -*

trunc περιμένουμε να μην προσδεθεί στα σφαιρίδια και να απομακρυνθεί στο *flow through* επειδή δεν διαθέτει πλέον την ετικέτα συγγένειας GST, ενώ η πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα GST, θα πρέπει να προσδεθεί πάνω στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα A και έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών με το διάλυμα B.

Ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων με τη μέθοδο SDS-PAGE και έγινε συμπύκνωση του κλάσματος που περιείχε την *rmPhK-γ-trunc* με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώτατο όριο 10000 Da στα 4000g στους 4°C. Στη συμπυκνωμένη πρωτεΐνη προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (50 % τελική συγκέντρωση) και η πρωτεΐνη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20 °C.

Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων

Σε κάποια βακτηριακά γένη (*Micrococcus*, *Haemophilus* και *Bacillus*) παρατηρείται φυσικός μετασχηματισμός, διότι στην επιφάνεια της μεμβράνης συναντώνται πρωτεΐνες που προσδέουν άμεσα εξωγενές DNA το οποίο και μεταφέρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η *E. Coli* δεν διαθέτει σύμφωνα με αναφορές τέτοιου είδους πρωτεΐνες και ως εκ τούτου δε συμβαίνει γενετικός μετασχηματισμός αυθόρμητα στα κύτταρα αυτά. Υπάρχουν πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους (πορίνες) σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (περίπου 105 μόρια πορίνης ανά κύτταρο) στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες σχηματίζουν ένα μοριακό ηθμό για την παθητική μεταφορά υδρόφιλων μορίων με μέγιστο μοριακό βάρος έως 5000 Da. Κατά συνέπεια, μακρομόρια όπως το DNA δεν μπορούν να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα της *E.coli*.

Μετασχηματισμός ονομάζεται η πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς DNA από το περιβάλλον στο γονιδίωμα των βακτηρίων. Τα βακτηριακά κύτταρα που είναι ικανά να προσλάβουν εξωγενές DNA ονομάζονται επιδεκτικά. Η εξωτερική μεμβράνη της *E.coli* καθίσταται αντιστρεπτά διαπερατή σε μακρομόρια μέσω πλασμόλυσης έπειτα από επώαση με Ca²⁺. Το CaCl₂, αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών OmpC, OmpA κ.α. οι οποίες είναι πορίνες και έχουν ωσμωρυθμιστικό ρόλο στους πρωκαρυώτες. είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού εξαρτάται αποκλειστικά από την πλασμόλυση που συμβαίνει παρουσία του CaCl₂. [35]

Από καλλιέργεια μητρικών κυττάρων που έχει επωαστεί όλη τη νύχτα (37°C/210rpm) σε LB θρεπτικό μέσο και παρουσία τετρακυκλίνης τελικής συγκέντρωσης 10μg/ml, εμβολιάζονται 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB παρουσία του ίδιου αντιβιοτικού. Η επώαση της καλλιέργειας γίνεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώσπου η οπτική πυκνότητα του δείγματος OD_{600nm} να ισούται με 0.5-0.7, όπου και θεωρείται πως η καλλιέργεια βρίσκεται στο

ανώτερο σημείο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Σε αυτό το στάδιο, το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε παγωμένους σωλήνες τύπου falcon των 50mL, στις 4000rpm για 6min στους 4 ° C και έπειτα τοποθετείται στον πάγο για 14 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl₂ και αφήνεται για 20min στον πάγο. Γίνεται ξανά φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 6min στους 4 ° C και επαναδιαλύεται σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 12-16h. Τέλος, τα βακτήρια αραιώνονται σε γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση), διαμοιράζονται σε σωλήνες τύπου errendorf σε κλάσματα των 100μL και αποθηκεύονται στους -80°C μετά από ταχεία ψύξη (flash freeze) σε παγωμένη αιθανόλη 100% (-80°C). Σημειωτέον ότι όλοι οι χειρισμοί πλην της επώασης πραγματοποιούνται σε ψυχρό θάλαμο (4 ° C) και πάγο, με αποστειρωμένα υλικά και εργαλεία σε στείρες συνθήκες. [36]

Απομόνωση και καθαρισμού της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb)

Η μέθοδος απομόνωσης της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων έγινε με τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Fisher & Krebs. Αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοαιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

ΥΛΙΚΑ:

- 3 αρσενικοί κόνικλοι ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6,8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα κορεσμού 90 % (NH₄)₂SO₄
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7,0
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1 M, pH 8
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.001M (pH 7,5)
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7,0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, 1.0 M pH 7,0
- Γλυκερόλη

Πειραματική Διαδικασία:

Ημέρα 1η

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος: Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω άκρα καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από τους τρεις αρσενικούς κονίκλους και τοποθετείται αμέσως σε πάγο. Ακολουθεί ομογενοποίηση του ιστού με τη χρήση μηχανής του κιμά. Ζυγίζουμε και επανατοποθετούμε σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού. Γίνεται εκχύλιση του ομογενοποιημένου ιστού με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές εν ψυχρώ. Τις δύο πρώτες φορές χρησιμοποιείται ίσος όγκος κιμά και απιονισμένου νερού, ενώ στην τρίτη εκχύλιση χρησιμοποιείται μισός όγκος ύδατος σε σχέση με τον όγκο του κιμά. Γίνεται διήθηση μέσω διπλής γάζας και η όλη διαδικασία δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 30 min. Με τον τρόπο αυτόν η GPb εξέρχεται από τα ζωικά κύτταρα.

Για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών γίνεται διήθηση του εκχυλίσματος μέσω υαλοβάμβακα.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον:

Ρυθμίζουμε το pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε τιμή 5,1 – 5,2 με προσθήκη 1 N CH₃COOH υπό ελαφρά ανάδευση. Παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 λεπτά και ύστερα φυγοκεντρείται (4 °C, 4.225 g, 30min).

Αμέσως μετά τη φυγοκέντριση το υπερκείμενο υγρό διηθείται με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αιωρούμενου υλικού. Κατόπιν έγινε ρύθμιση του pH σε 6,8 με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO₃ για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος καθώς αυτό αποτελεί το ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το δείγμα ογκομετρήθηκε και βρέθηκε (4,910L)

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

Έγινε καταβύθιση του ένζυμου με θειικό αμμώνιο κορεσμού 41%, ύστερα από την προσθήκη θειικού αμμωνίου 90% με όγκο ίσο προς 0.837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος. Ακολούθως το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία 4 °C για περίπου 16 ώρες.

Ημέρα 2η

Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου με την χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (5110 g, 40 min, 4 °C). Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται ενώ γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος και σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος ακολούθησε διαπίδυση σε θερμοκρασία 4 °C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος *Tris* 0.001M (pH 7.5), για 16 ώρες.

Ημέρα 3η

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Την επόμενη μέρα μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε (34.540 g, 15min, 4 °C) με στόχο τη διαύγασή του. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 0.3M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7,0, διαλύματος EDTA 0.1M, pH 7,0. Και διαλύματος 2M *Tris* ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση, ενώ η τιμή του pH παρακολουθείται με πεχάμετρο. Στη συνέχεια έγινε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία 37 °C επί 1 ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολουθεί ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 10-15 λεπτά) και αμέσως μετά προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1 N για να ρυθμιστεί το pH σε τιμή 7,0. Τέλος έγινε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση (34.540 g, 10min, 25°C)

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

Έγινε ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού διαλύματος μετά τη φυγοκέντρηση και προστέθηκαν τα εξής διαλύματα: Διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7,0, διάλυμα (CH₃COO)2Mg, pH 7,0. Το διάλυμα τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε θερμοκρασία 0°C για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί.

Ημέρα 4η

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση (28.710 g, 4 °C, 10min). Η θερμοκρασία της φυγοκέντρου ρυθμίζεται στους 25 °C. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6,8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση (28.710 g, 10min, 25°C). Γίνεται ογκομέτρηση του υπερκείμενου και κατόπιν προσθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7,0 και διαλύματος (CH₃COO)2Mg, pH 7,0. Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρήθηκε στις 28710 g για 10 min σε θερμοκρασία 25-30 °C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)2Mg, όπως ακριβώς έγινε στην κρυστάλλωση. Αφήσαμε το μίγμα ώστε να γίνει κρυστάλλωση στους 0 °C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης διεξήχθησαν τουλάχιστον τρεις φορές με προσθήκη AMP, (CH₃COO)2Mg, και δύο φορές απουσία AMP και (CH₃COO)2Mg.

Ημέρα 5^η

Μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, οι κρύσταλλοι της *rmGPb* αφού συλλέχθηκαν, διαλυτοποιήθηκαν με επώαση σε θερμοκρασία 30 °C και ακολούθησε φωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσής της σε μήκος κύματος 280 nm (ο

συντελεστής μοριακής απορρόφησης για την *rmGPb* ισούται με 1.32). Τέλος προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20 °C (50 % v/v γλυκερόλη).

Αναλυτικές Μέθοδοι

Κινητικές μελέτες

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που απομονώθηκε, υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με στόχο το προσδιορισμό της σταθεράς συγγένειας μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος (K_m , Michaelis-Menten, V_{max}). Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες προσδιορισμού της IC_{50} .

Έγινε διαλυτοποίηση των χημικών ενώσεων που μελετήθηκαν σε κατάλληλο όγκο DMSO ώστε να έχουν συγκέντρωση 5 mg/mL. Στα πειράματα η τελική συγκέντρωση του DMSO πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 2 % (v/v). Επίσης, η K_m του ενζύμου προσδιορίστηκε παρουσία 1% (v/v) DMSO, ενώ χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της IC_{50} .

Το assay για τις κινητικές μελέτες πάνω στο ένζυμο της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περιλαμβάνει δύο στάδια. Τα στάδια αυτά αποτελούν στην ουσία δύο διαφορετικές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση η κινάση με υπόστρωμα το ATP φωσφορυλιώνει την φωσφορυλάση μετατρέποντάς την από την μορφή β στην ενεργό μορφή α. Η πρώτη αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 20μL σε buffer TEA χωρίς να αποδιατάσσονται τα ένζυμα. Αμέσως μετά 100μL από την αντίδραση αυτή προστίθενται στην δεύτερη αντίδραση. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου Glycogen(n), προς Glycogen (n-1) και απελευθέρωση 1-φωσφορικής-γλυκόζης (G1P) σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση



Όμως στην παρούσα πειραματική διαδικασία, μελετάται η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή η ενσωμάτωση της G1P στο μακρομόριο του γλυκογόνου με ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πίνακας 1 Αντιδραστήρια κινητικών μελετών και η δράση τους

ATP	Υπόστρωμα της κινάσης για τη μεταφορά φωσφορικής ομάδας και τη φωσφορυλίωση της GPb
GPb	Μετατρέπεται σε GPα στην 1 ^η φάση της αντίδρασης και στη 2 ^η (ως GPα) ενώνει την G1P με το γλυκογόνο προς σχηματισμό

	Glycogen(n+1) και Pi
PhK	Μετατρέπει την ανενεργό GPb σε ενεργό GPa
Buffer 4x	Περιέχει Tris 200mM pH8,2, Hepes 200mM, CaCl ₂ 2mM, DTT 8mM, MgCl ₂ 40mM

G1P	Ενώνεται με το γλυκογόνο προς σχηματισμό Glycogen(n+1) και Pi από την GPa
Caffeine	Ο συνδυασμός αυτών των δύο στις συγκεντρώσεις που αναλύονται παρακάτω αφήνει ενεργό μόνο την GPa και απενεργοποιεί πλήρως την GPb[37]
AMP	
Glycogen	Μετατρέπεται σε Glycogen(n+1) και Pi από την GPa

Για την κινητική μελέτη της PhK απαιτείται κάποια προετοιμασία. Αρχικά για την αραίωση της PhK παρασκευάζεται διάλυμα BSA 10mg/ml, Tris 40mM pH 8,2 που στην τελική αντίδραση έχει συγκέντρωση BSA 0,5mg/ml και Tris 2mM. Επομένως, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαθέτει επιπλέον BSA, το οποίο προστίθεται ώστε να αποτρέψει την προσκόλληση του ενζύμου στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα κατά τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αραίωση της GPb έγινε σε διάλυμα 50:50:1 (του οποίου η παρασκευή περιγράφηκε πιο πάνω). Ακόμη απαιτείται η παρασκευή διαλύματος Buffer 4x (Tris 200mM pH8,2, Hepes 200mM, CaCl₂ 2mM, DTT 8mM, MgCl₂ 40mM).

Αρχικά έγιναν μελέτες με διαφορετικές συγκεντρώσεις κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση που θα ενεργοποιούσε αρκετά τη φωσφορυλάση αλλά όχι σε βαθμό που οι μετρήσεις κατά τη φωτομέτρηση να είναι υπερβολικά μεγάλες. Οι μετρήσεις έγιναν παρουσία ATP 0,5mM και GPb 1mg/ml. Οι συγκεντρώσεις κινάσης που μελετήθηκαν ήταν 0,5, 1 και 2ng/ml.

Επιπλέον έγιναν παρόμοια πειράματα για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση DMSO που δεν θα παρεμπόδιζε τις ενζυμικές αντιδράσεις. Έτσι δοκιμάσθηκαν συγκεντρώσεις DMSO 0, 0,5, 1, 2, 5, 10%.

Οι κινητικές παράμετροι μελετώνται ως προς ATP και ως προς GPb. Αυτό σημαίνει ότι στην πρώτη σειρά πειραμάτων παρέμενε σταθερή η συγκέντρωση της GPb ενώ στη δεύτερη το ATP. Το διάλυμα 4x είχε τελική συγκέντρωση 1x και η PhK 1ng/ml. Τα

ενζυμικά διαλύματα παρασκευάζονται σε σωληνάρια με τελευταία την προσθήκη ATP. Κατόπιν τα σωληνάρια τοποθετούνται για επώαση στους 30°C σε υδατόλουτρο για 2-3 λεπτά. Για όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν τυφλοί μάρτυρες που δεν περιείχαν κινάση αλλά Buffer αραίωσης κινάσης ίσου όγκου. Για να ξεκινήσει η αντίδραση, τελευταία προστίθεται στο σωληνάριο του υποστρώματος η κινάση (20μL) ή στην περίπτωση των τυφλών-μαρτύρων το Buffer αραίωσης κινάσης.

Πίνακας 2 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων

	Συγκέντρωση					
Buffer 4x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Κινάση	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml
GPb	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml	3mg/ml	4mg/ml	5mg/ml
ATP	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM

	Συγκέντρωση				
Buffer 4x	1x	1x	1x	1x	1x
Κινάση	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml
GPb	4mg/ml	4mg/ml	4mg/ml	4mg/ml	4mg/ml
ATP	0,04mM	0,08mM	0,12mM	0,3mM	0,6mM

Η πρώτη αντίδραση έχει τελικό όγκο 200 μL. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (τριών λεπτών) λαμβάνονται δείγματα των 20μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν σε 980μL διάλυμα TEA στον πάγο. Για το δεύτερο μέρος της αντίδρασης, 100μL από το διάλυμα TEA προστίθενται σε 100μL διαλύματος που περιέχει AMP 10μM, G1P 10mM, Glycogen 0,2% και Caffeine 0,5mM. Τα μίγματα αυτά έχουν προηγουμένως επωαστεί στους 30°C για 2 λεπτά. Ο χρόνος της δεύτερης αντίδρασης είναι 12 λεπτά και πραγματοποιείται επίσης στο υδατόλουτρο στους 30°C. Μετά το πέρας και της δεύτερης αντίδρασης, 40μL του συγκεκριμένου μίγματος προστίθενται σε 10 μL διαλύματος SDS 1% (w/v) κι αυτό διότι παρουσία απορρυπαντικού τα ένζυμα αποδιατάσσονται και αδρανοποιούνται. Για μεγαλύτερη σιγουριά πραγματοποιείται έντονη ανάδευση στο vortex για την ολοκληρωτική αδρανοποίηση των ενζύμων.

Στη συνέχεια ακολουθεί φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου που είναι το προϊόν της αντίδρασης με τη μέθοδο ανάλυσης σε διάλυμα ασκορβικού. Εκτός

από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλούς μάρτυρες, που περιέχουν μόνο sds και ορθοφωσφορικά (Pi).

Προσδιορισμός φωσφόρου

Για τον προσδιορισμό του φωσφόρου χρησιμοποιείται μια πολύ συνηθισμένη μέθοδος. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η απελευθέρωση αυτή επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η αρχική μέθοδος τροποποιήθηκε και βελτιστοποιήθηκε πολλές φορές κάτι που καταδεικνύει τη χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου[38]

Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία μιας έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης που δημιουργείται σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγής αυτής με ασκορβικό οξύ. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου σε pH το οποίο ρυθμίζεται στην τιμή 5,0 με τη χρήση πυκνού διαλύματος HCl. Κατόπιν παρασκευάζεται διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) σε pH το οποίο ρυθμίζεται στη τιμή 5,0 με τη χρήση πυκνού διαλύματος NaOH.

Τα δύο διαλυμάτα προετοιμάζονται όπως περιγράφηκε παραπάνω και ακολουθεί η ρύθμιση του pH. Στη συνέχεια το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου αναμειγνύεται με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε αδιαφανές δοχείο. Αφήνονται προς επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Ακολουθεί προσθήκη στα δείγματα ποσότητας του διαλύματος και 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 (Zn²⁺) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ. Το χρωμοφόρο που παράγεται έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Με σκοπό το προσδιορισμό της ποσότητας των ορθοφωσφορικών ανιόντων στο δείγμα, παρασκευάζεται ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, με το οποίο προσδιορίζεται η οπτική απορρόφηση, και λειτουργεί ως πρότυπο με βάση το οποίο γίνεται ο υπολογισμός της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση σε κάθε δείγμα (που είχε τελικό όγκο 50μL) προστίθενται 700μL διαλύματος ασκορβικού, γίνεται έντονη ανάδευση των σωληναρίων στο vortex και αμέσως μετά επώαση για 15min στους 30°C (υδατόλουτρο). Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm.

Σάρωση αναστολέων

Για να διαπιστωθεί ποιοι από τους αναστολείς ελαττώνουν τη δραστικότητα της ΡhK, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η σάρωσή τους. Δηλαδή πραγματοποιείται κινητική μελέτη για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση αναστολέα (στην προκειμένη περίπτωση 50μΜ) και για συγκεκριμένο χρόνο (10min).

Προσδιορισμός IC50 αναστολέα

Η μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου καθώς και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων έρχεται σαν αποτέλεσμα της παρουσίας του αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η μελέτη της κινητικής του ενζύμου παρουσία κάποιου αναστολέα ο οποίος βρίσκεται σε συγκέντρωση στην περιοχή της IC50 και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P αποτελεί προϋπόθεση του προσδιορισμού της σταθεράς αυτής. Η IC50 ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστικότητας. Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC50, οι ειδικές δραστικότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστικότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Τα πειραματικά δεδομένα αναδεικνύουν τις ειδικές δραστικότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση (για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα). Η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{s.a.control - s.a.i}{s.a.control} \times 100\%$$

όπου

s.a.control: είναι η ειδική δραστικότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα,

s.a.i: είναι η ειδική δραστικότητα του ενζύμου παρουσία i συγκέντρωσης αναστολέα,

s: αποτελεί την κλίση

Η τιμή της IC50 υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$Y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{X}{IC50}\right)^S}$$

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εξίσωση η τιμή του γ είναι αντιστρόφως ανάλογη του x, δηλαδή όσο η τιμή του x αυξάνεται, τόσο μειώνεται η τιμή του γ. Προκειμένου τα αποτελέσματα που θα προκύπτουν να είναι αξιόπιστα θα πρέπει να υπάρχουν τιμές εκατέρωθεν της τιμής της IC50. Τέλος, η τιμή της IC50 προκύπτει από το διάγραμμα **% αναστολή = f([I])**.

Ο κάθε αναστολέας διαλυτοποιείται σε 100% DMSO ώστε να προκύψουν πολλές διαφορετικές συγκεντρώσεις για να βρεθεί η τιμή της IC50. Η σταθερή συγκέντρωση της G1P είναι 10 mM, της AMP 10 μΜ, της GPb 1mg/ml, του ATP 0.1mM και του DMSO 1%. Ακόμη, σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control)

το οποίο περιέχει όλα τα υπόλοιπα εκτός από αναστολέα. Αντί για αναστολέα προστίθεται ίση ποσότητα DMSO (τελικής συγκέντρωσης 1% (w/v))

Για τους αναστολείς που ελάττωσαν περισσότερο την δραστικότητα της PhK προσδιορίστηκε η IC₅₀.

Μελέτη αναστολής στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Οι παραπάνω αναστολείς μελετήθηκαν εκ νέου για να βρεθεί κατά πόσο αναστέλλουν το δεύτερο ένζυμο που συμμετέχει στην αντίδραση, την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Κάτι τέτοιο δεν θα ήταν επιθυμητό διότι θα έδινε ψευδή αποτελέσματα σχετικά με την αναστολή της δραστικότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η πρώτη αντίδραση κατά την οποία η κινάση φωσφορυλιώνει την φωσφορυλάση και την ενεργοποιεί. Στη φάση αυτή δεν έχει προστεθεί αναστολέας. Εκτός από τα δείγματα που εξετάστηκαν ως προς τη δράση του αναστολέα υπήρχε και ένας θετικός μάρτυρας (με κινάση αλλά χωρίς αναστολέα, control) και ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς κινάση με αναστολέα, τυφλό)

Πίνακας 3 Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη μελέτη της αναστολής στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου

	Control	Διάλυμα αναστολέα	με	Τυφλό
Buffer 4x	1x	1x		1x
PhK	1ng/ml	1ng/ml		-
ATP	0,1mM	0,1mM		0,1mM
GPb	1mg/ml	1mg/ml		1mg/ml

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δεύτερη αντίδραση στην οποία είχε προστεθεί και ο αναστολέας σε συγκέντρωση 10μM.

	Control	Διάλυμα αναστολέα	με	Τυφλό
G1P	10mM	10mM		10mM
Caffeine	0,5mM	0,5mM		0,5mM

AMP	10μM	10μM	10μM
Glycogen	0,2%	0,2%	0,2%
DMSO	1%	1%	1%
Αναστολέας	-	10μM	10μM

Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit βοήθησε στην ανάλυση των κινητικών δεδομένων και την παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων. Ο υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί προϋπόθεση για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max} , IC_{50}).

Αρχικά με βάση την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών ιόντων, οι οπτικές απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την οπτική απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P και της παρουσίας φωσφορικών ιόντων στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μολι φωσφορικών. Ο υπολογισμός των μολι φωσφορικών ιόντων που παράγονται κατά την αντίδραση σύμφωνα με τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, είναι το πρωταρχικό βήμα για να υπολογισθεί η ειδική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα φωσφορικών ιόντων 1 mM. Το διάλυμα 1 mM περιέχει 0.04 μολι φωσφορικών ιόντων στα 40 μL. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό εμφανίζει απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.04 μολι φωσφορικών ιόντων. Με βάση αυτό υπολογίζεται η ποσότητα των φωσφορικών ιόντων σε μολι για κάθε δείγμα.

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

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

Όπου

V: η ταχύτητα της αντίδρασης

V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα

[S]: η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_m : η σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της V_{max} .

In silico μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης

In silico είναι μία φράση που αναφέρεται σε επιστημονικές μελέτες που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης σε υπολογιστή. Ο όρος δεν είναι στην πραγματικότητα λατινικός αλλά επινοήθηκε από τον μαθηματικό Pedro Miramontes το 1989 αναφερόμενος σε πειράματα που γίνονταν στον υπολογιστή ως ανάλογο των λατινικών φράσεων *in vivo*, *in vitro* κτλ. [39] Η τεχνολογία αυτή έχει συμβάλλει στη μελέτη υπαρχουσών δομών βιομορίων, στη σύγκρισή τους καθώς και στη δημιουργία τρισδιάστατων μοντέλων (πρόβλεψη δομής) για βιομόρια για τα οποία είναι γνωστή μόνο η αλληλουχία του DNA. Ακόμη ορισμένα προγράμματα δύνανται να προβλέψουν τη λειτουργία των βιομορίων αυτών συγκρίνοντάς τα με υπάρχοντα μοντέλα. Τέλος είναι δυνατή η πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνικών μορίων με διάφορα μόρια-συνδέτες όπως είναι οι αναστολείς. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται *docking*. [40]

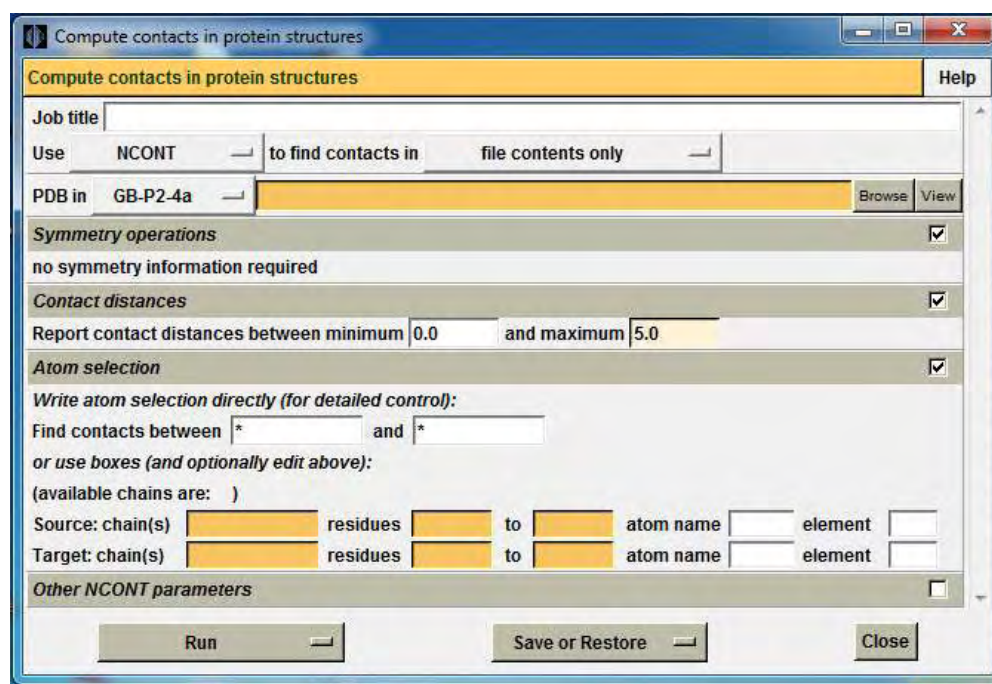
Δομικές αναλύσεις *in silico*

Μετά τις κινητικές μελέτες ακολούθησαν *in silico* μελέτες για να βρεθεί η πιθανή σύνδεση κάθε αναστολέα με την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *Docking*. Οι αναστολείς προετοιμάστηκαν για υπολογισμούς χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *LigPrep 3.6*, ενώ για την PhK χρησιμοποιήθηκαν τα PDB για την κουνελίσια μυϊκή και την ανθρώπινη ηπατική ισομορφή (PDB IDs: 1PHK και 2Y7J αντίστοιχα). Η αρχική ρύθμιση των δομών PhK πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον “*Protein Preparation Wizard*” του Schrodinger. Τα μόρια νερού (και τα ιόντα μετάλλων) διαγράφηκαν. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το *Induced Fit Docking* του Schrodinger για να δημιουργηθούν τα τελικά μοντέλα με τις εκάστοτε συντεταγμένες του κάθε ενζύμου με τον αντίστοιχο αναστολέα. Η γεωμετρία της δραστικής θέσης ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγονται από το δεσμευμένο προσδέτη. Ωστόσο, η επίλυση της κρυσταλλογραφικής δομής ενός συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη απαιτεί πολύ χρόνο και είναι συχνά ανέφικτη ή αδύνατη. Το πρωτόκολλο του *Induced Fit (IFD)* του Schrodinger επιλύει αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιώντας τα *Glide* και *Prime* για να εξετάσει όλους τους πιθανούς τρόπους δέσμευσης και τις σχετικές αλλαγές διαμόρφωσης που προκαλεί η σύνδεση ενός προσδέτη. Το πρωτόκολλο *Induced Fit* αρχίζει με την προσάρτηση του προσδέτη στο ένζυμο με το *Glide*. Για κάθε διαφορετικό προσανατολισμό, στη συνέχεια χρησιμοποιείται το *Prime* προβλέπει μια δομή για να τοποθετήσει τον προσδέτη αναπροσανατολίζοντας τις κοντινές πλευρικές αλυσίδες. Τελικά, κάθε προσδέτης συνδέεται ξανά στις αντίστοιχες δομές πρωτεϊνών χαμηλής ενεργείας και τα προκύπτοντα σύμπλοκα κατατάσσονται σύμφωνα με το *GlideScore*.

Εύρεση αλληλεπιδράσεων

Με το πρόγραμμα *CCP4* γίνεται εύρεση των εν δυνάμει δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ του ενζυμικού μορίου και του μορίου του αναστολέα. Το πρόγραμμα μετράει τις

αποστάσεις μεταξύ των δύο μορίων με βάση τα στοιχεία που θα δώσουμε εμείς. Οι δεσμοί που μελετήθηκαν ήταν οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με τα αμινοξέα που απαρτίζουν την θέση πρόσδεσης του ATP της κινάσης. 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*.



Εικόνα 7 Το user interface του προγράμματος CONTACT του CCP4

Στοιχισή αλληλουχιών

Σκοπός αυτής της μελέτης, όπως προαναφέρθηκε, ήταν η αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυσικών εκχυλισμάτων στο ένζυμο της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ένα επιπλέον όμως επιθυμητό χαρακτηριστικό των αναστολέων αυτών ήταν και η εξειδίκευσή τους ως προς την κινάση. Οι κινάσες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων με σημαντικό ρόλο σε ποικίλα μεταβολικά και άλλα μονοπάτια. Αναμένεται λοιπόν να παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ τους και ιδιαίτερα στις καταλυτικές τους περιοχές. Για το λόγο αυτό έγινε στοιχισή των αλληλουχιών γνωστών κινασών. Σκοπός μας ήταν η σύγκριση των περιοχών στις οποίες συνδέεται ο αναστολέας. Εάν οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης τότε είναι πιθανόν να μπορούν να συνδεθούν σε αυτές οι αναστολείς που συνδέονται με την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την στοιχισή των αλληλουχιών των κινασών ήταν το Clustal Omega και το kaligh της EMBL και το Clustalw της Genomenet.

Οι αλληλουχίες κινασών που στοιχίστηκαν ήταν η ανθρώπινη ηπατική ισομορφή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1PhK, **PDB ID:2y7j**), η ανθρώπινη cycline

dependent kinase (cdk2, **PDB ID:1b38**), η ανθρώπινη cAMP-εξαρτώμενη κινάση (cAPK, **PDB ID:3nx8**), η κινάση της καζεΐνης του είδους *Schizosaccharomyces pombe* (CK1, **PDB ID:1csn**), η ανθρώπινη κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3, **PDB ID:6gn1**), ο ανθρώπινος υποδοχέας της ινσουλίνης- κινάση τυροσίνης (**PDB ID:3ekk**) και η ηπατική ισομορφή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του είδους *Danio rerio* (zebra fish) (zflPhK)

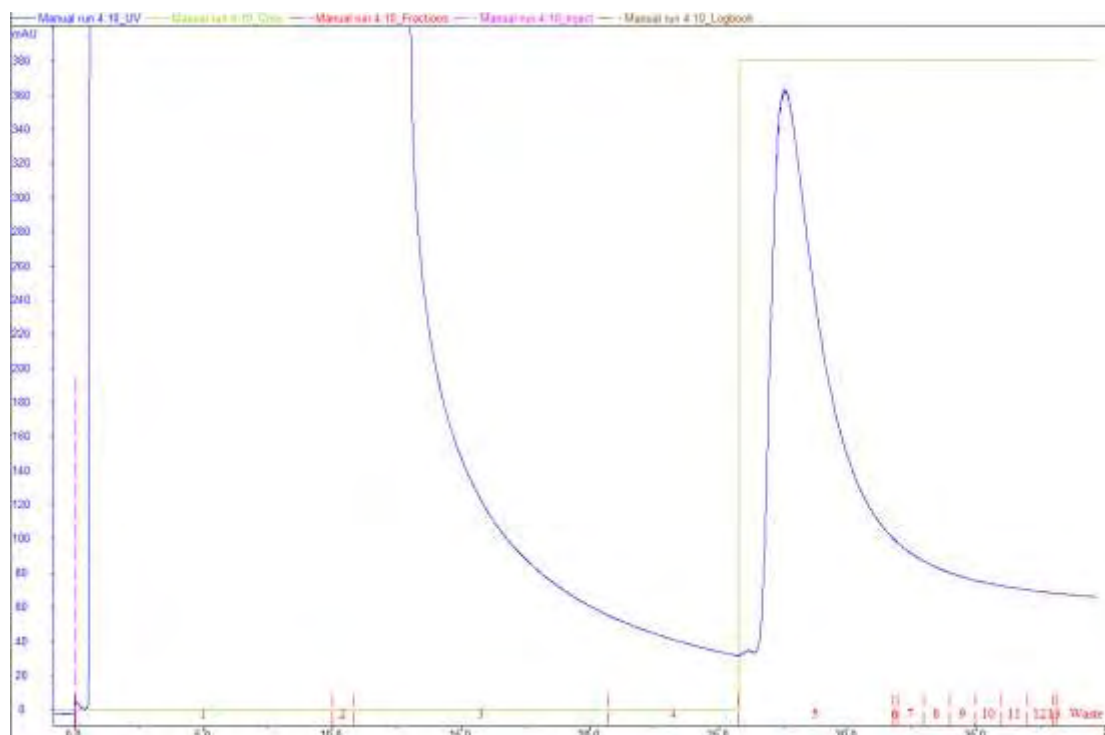
Αποτελέσματα-Συζήτηση

Καθαρισμός και απομόνωση της κολοβωμένης γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmPhK_γ)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το γονίδιο που κωδικοποιεί τη γ-καταλυτική υπομονάδα της μυϊκής ισομορφής της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων υπερεκφράστηκε σε βακτηριακά στελέχη B834rlyss (DE3), με σκοπό τη μελέτη της πρωτεΐνης σε κινητικά πειράματα. Η πρωτεΐνη εμφανίζει συγγένεια με τη γλουταθειόνη, λόγω του φορέα έκφρασης στον οποίο έχει εισαχθεί (pGEX-6P-1) και επομένως το πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της στηρίζεται σε αυτή τη συγγένεια. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω, ο άξονας των χχ' αναφέρεται στον όγκο (σε mL) καθώς και στην αρίθμηση των κλάσματος, ενώ στον άξονα γγ' αναφέρεται η απορρόφηση στο UV (mAU-280nm) του δείγματος καθώς εξέρχεται από τη στήλη.

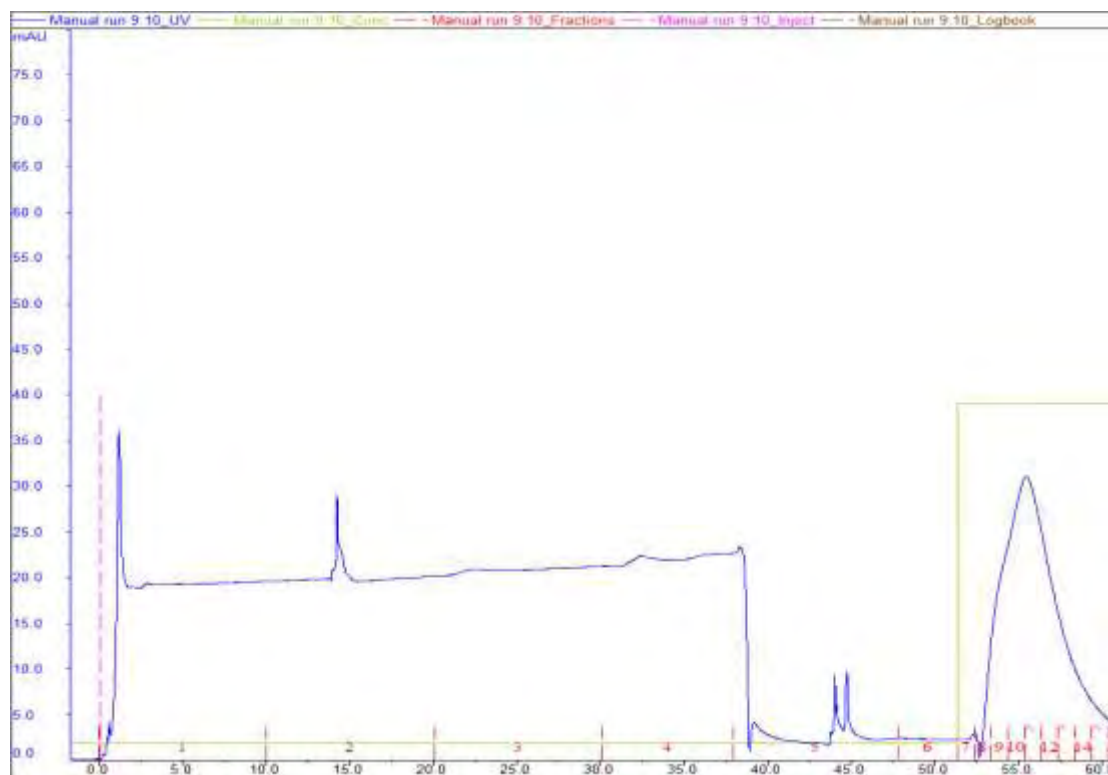
Στάδιο 1: Χρωματογραφία συγγένειας (Protino GST/4B)

Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται στα κλάσματα 5, 6, 7 σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Η εκλουσμένη rmPhK_γ περιέχεται στα κλάσματα 5-8. Τα κλάσματα 1-3 του χρωματογραφήματος περιέχουν τις πρωτεΐνες του υπερδιηθήματος που δεν προσδέθηκαν στη στήλη ενώ, τέλος, το κλάσμα 4 περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν ισχυρά στη στήλη και απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια της έκπλυσής της. (Εικόνα)

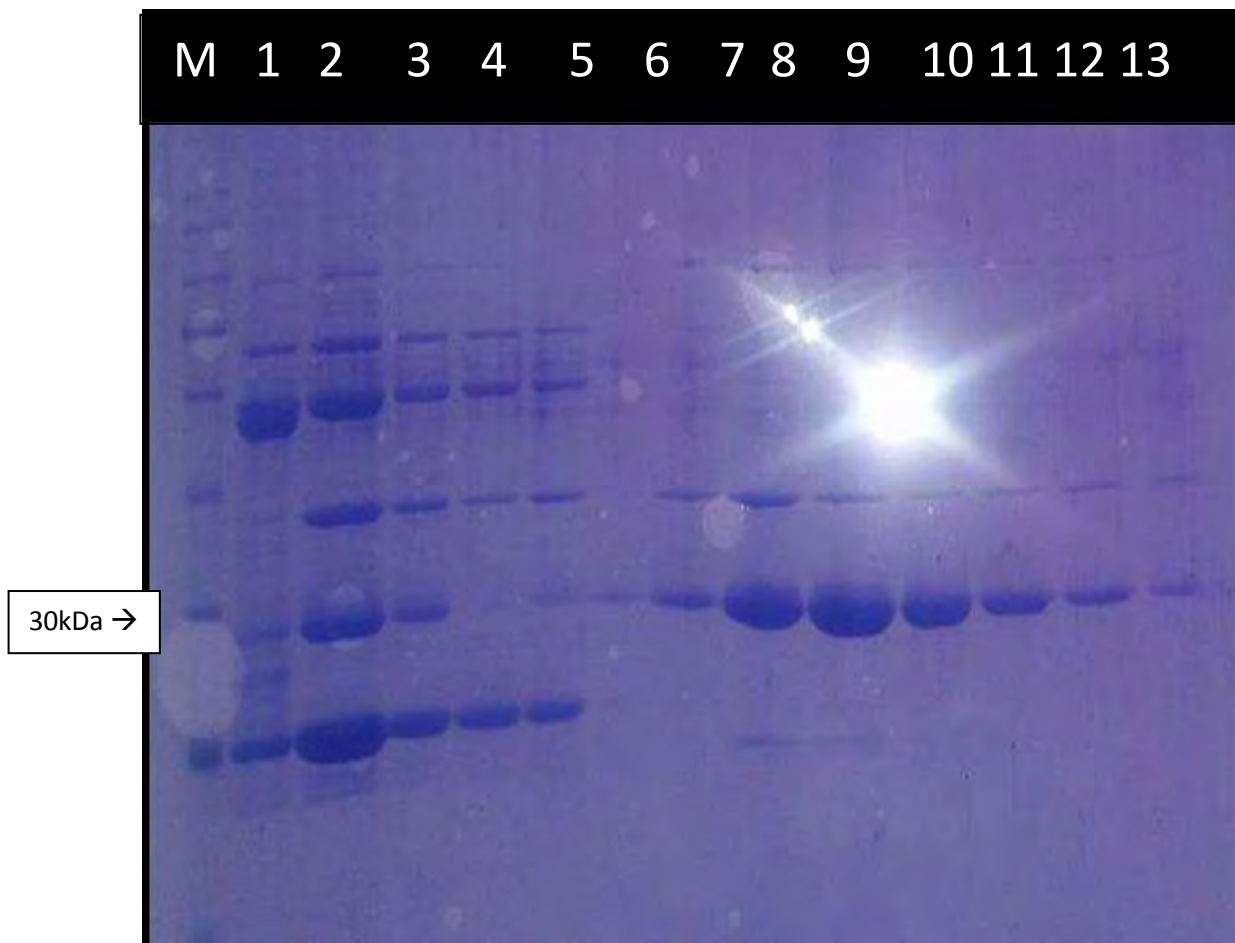


Εικόνα 8 Χρωματογράφημα για τη στήλη συγγένειας (GST) κατά το πρώτο στάδιο καθαρισμού της rmPhK. Τα κλάσματα 1-3 περιείχαν τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (Flow-through), τα κλάσματα 5-8 έχουν την περισσότερη πρωτεΐνη.

Στάδιο 2: Χρωματογραφία συγγένειας (HiTrapBlueHP-Cibacron Blue) Από τα παραπάνω κλάσματα τα 5-8 της προηγούμενης στήλης υπέστησαν κατεργασία από την πρωτεάση 3C για χρονικό διάστημα 16 ωρών σε θερμοκρασία 4 °C με σκοπό την πρωτεολυτική διάσπαση του επιτόπου GST. Όπως και στο προηγούμενο στάδιο καθαρισμού τα κλάσματα 1-4 του χρωματογραφήματος περιείχαν τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (Flow-through), τα κλάσματα 5-6 περιείχαν τις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκπλυσης της, ενώ τα κλάσματα 7-15 περιείχαν την εκλουσμένη gmPhKγ.

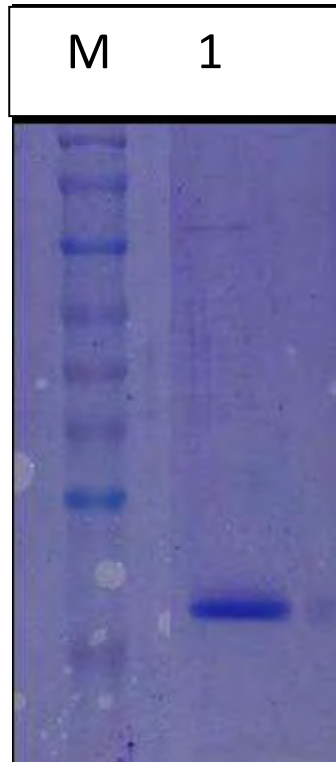


Εικόνα 9 Χρωματογράφημα για τη 2^η στήλη (Cibacron Blue). Τα κλάσματα 1-4 περιείχαν τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (Flow-through), τα κλάσματα 5-6 αποτελούν τις πρωτεΐνες κατά την έκπλυση (Wash) και τα κλάσματα 7-15 την εκλουσμένη gmPhKγ.



Εικόνα 10 Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες για το δεύτερο στάδιο του καθαρισμού της gmPhK. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το αραιωμένο δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (Input). Στη δεύτερη διαδρομή τα κλάσματα 1-3. Στην τρίτη διαδρομή το κλάσμα 4. Στη διαδρομή 4 είναι δείγμα από τη συνένωση των κλασμάτων 5-7 του χρωματογραφήματος (Flow Through) ενώ οι υπόλοιπες διαδρομές περιέχουν τα κλάσματα 8-14 με τη σειρά.

Στάδιο 3: Χρωματογραφία συγγένειας (σφαιρίδια αγαρόζης με ακινητοποιημένη γλουταθειόνη) Για το διαχωρισμό της gmPhK_γ από την πρωτεάση 3C (η οποία διαθέτει ετικέτα συγγένειας GST) έγινε εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας με σφαιρίδια αγαρόζης που περιείχαν ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η gmPhK_γ δεν προσδέθηκε στη στήλη, ενώ η πρωτεάση 3C προσδέθηκε στη στήλη λόγω της συγγένειας που εμφανίζει. Στη διαδρομή 1 βρίσκεται η συμπυκνωμένη κινάση της φωσφορυλάσης (έγινε συμπύκνωση με φίλτρο με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους 10 kDa).



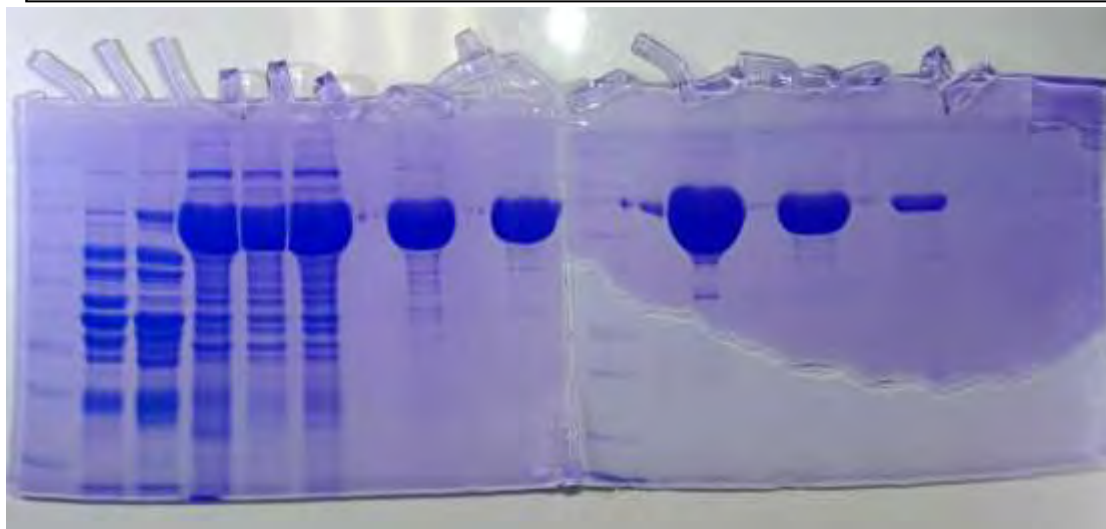
Εικόνα 11 Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες μετά το τρίτο και τελευταίο βήμα της απομόνωσης και μετά το στάδιο συμπύκνωσης. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται η καθαρή και συμπυκνωμένη gmPhKγ.

Μετά το τέλος του χρωματογραφικού καθαρισμού η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης, με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 10 kDa σε τελικό όγκο 0,1 mL. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford σε 1,1 mg/mL, ενώ η απόδοση της απομόνωσης ήταν 0,04 mg/L βακτηριακής καλλιέργειας. Η πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για κινητικές μελέτες και πιο συγκεκριμένα για φωσφορυλίωση της GPb σε GPα με τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω.

Καθαρισμός και απομόνωση της gmGP από σκελετικούς μυς κονίκλων

Η απομόνωση της gmGP έγινε από σκελετικούς μύες τριών αρσενικών κονίκλων. Η συνολική μάζα των μυών ήταν 2,378 kg. Στην Εικόνα παρουσιάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Σε αυτήν φαίνονται δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.

M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην 1η διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στη 2η διαδρομή μετά την κατεργασία με θειικό αμμώνιο. Στην Τρίτη μετά την θερμική κατεργασία. Στη διαδρομή 4 είναι δείγμα μετά τη 2^η φυγοκέντρηση και από την 5^η διαδρομή και μετά έχουμε δείγματα μετά από κάθε ανακρυστάλλωση

Παρατηρούμε ότι ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η *rmGPb*, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Φαίνεται μετά την τέταρτη ανακρυστάλλωση ότι έχει επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός καθαρότητας. Η συνολική απόδοση της απομόνωσης ήταν 1,084gr ανά kg μυϊκού ιστού.

Κινητικές Μελέτες

Σάρωση αναστολέων

Οι αναστολείς που μελετήθηκαν ήταν συνθετικά ανάλογα κουμαρίνης. Η συγκέντρωση του αναστολέα στην αντίδραση ήταν 50μM και ο χρόνος αντίδρασης ήταν 10min.

Οι αναστολείς που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αναστολή ήταν οι GB-P2-4a, GB-P2-4j, GB-P2-4o, GB-P2-4'α, GB-P2-4'ι και GB-P2-4'j

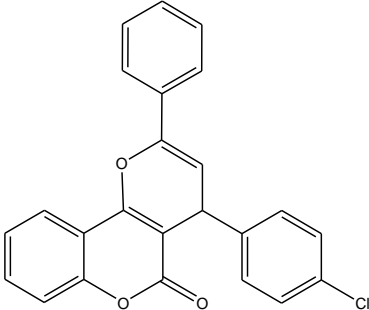
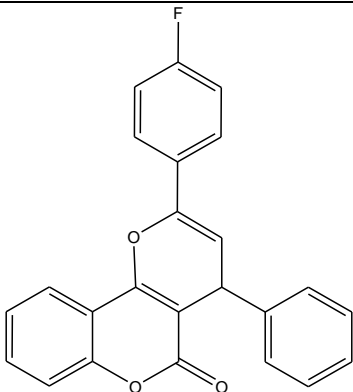
Πίνακας 4 Αποτελέσματα σάρωσης αναστολέων

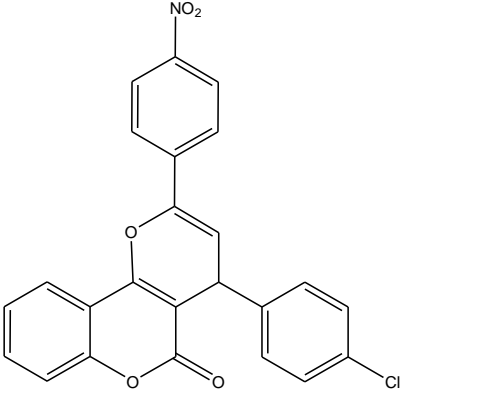
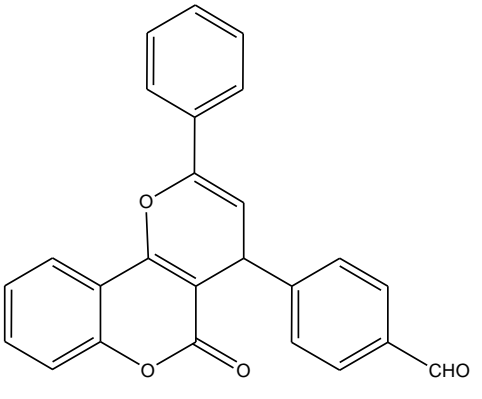
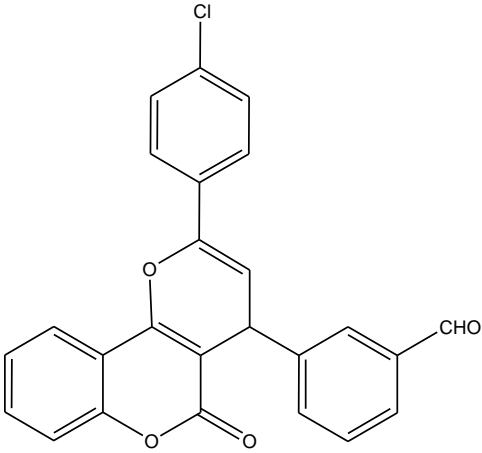
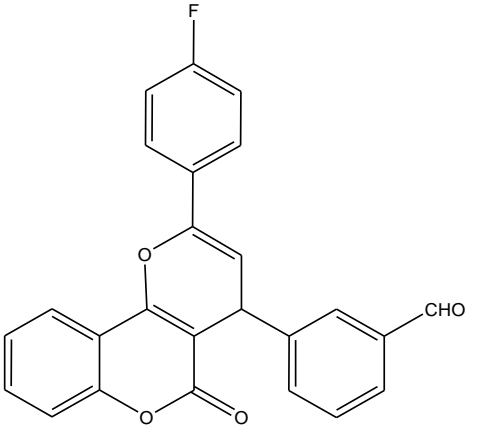
		50μM
1	GB-P2-4a	33%
2	GB-P2-4b	17%

3	GB-P2 -4c	6%
4	GB-P2-4d	4%
5	GB-P2-4e	8%
6	GB-P2-4f	7%
7	GB-P2-4g	10%
8	GB-P2-4h	12%
9	GB-P2-4i	8%
10	GB-P2-4j	18%
11	GB-P2-4k	7%
12	GB-P2-4l	2%
13	GB-P2-4m	13%
14	GB-P2-4n	4%
15	GB-P2-4o	17%
16	GB-P2-4p	3%
17	GB-P2-4q	16%
18	GB-P2-4r	15%
19	GB-P2-4s	4%
20	GB-P2-4t	18%
21	GB-P2-4u	13%
22	GB-P2-4v	9%
23	GB-P2-4w	9%
24	GB-P2-4x	16%
25	GB-P2-4y	6%
26	GB-P2 -4z	1%
27	GB-P2-4z'	5%
28	GB-P2-4z''	5%
29	GB-P2-4'a	32%
30	GB-P2-4'b	12%

31	GB-P2-4'c	16%
32	GB-P2-4'd	10%
33	GB-P2-4'e	13%
34	GB-P2-4'f	12%
35	GB-P2-4'g	12%
36	GB-P2-4'h	16%
37	GB-P2-4'i	28.5%
38	GB-P2-4'j	30%

Πίνακας 5 Δομή των αναστολέων που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αναστολή

	Χημικός Τύπος	50μM
GB-P2-4a		33%
GB-P2-4j		18%

GB-P2-4o	 <p>The structure shows a coumarin core with a nitro group (-NO₂) at the 4-position of the phenyl ring at the 3-position, and a chlorine atom (-Cl) at the 4-position of the phenyl ring at the 2-position.</p>	17%
GB-P2-4'a	 <p>The structure shows a coumarin core with a phenyl ring at the 3-position and a formyl group (-CHO) at the 4-position of the phenyl ring at the 2-position.</p>	32%
GB-P2-4'i	 <p>The structure shows a coumarin core with a chlorine atom (-Cl) at the 4-position of the phenyl ring at the 3-position, and a formyl group (-CHO) at the 4-position of the phenyl ring at the 2-position.</p>	28.5%
GB-P2-4'j	 <p>The structure shows a coumarin core with a fluorine atom (-F) at the 4-position of the phenyl ring at the 3-position, and a formyl group (-CHO) at the 4-position of the phenyl ring at the 2-position.</p>	30%

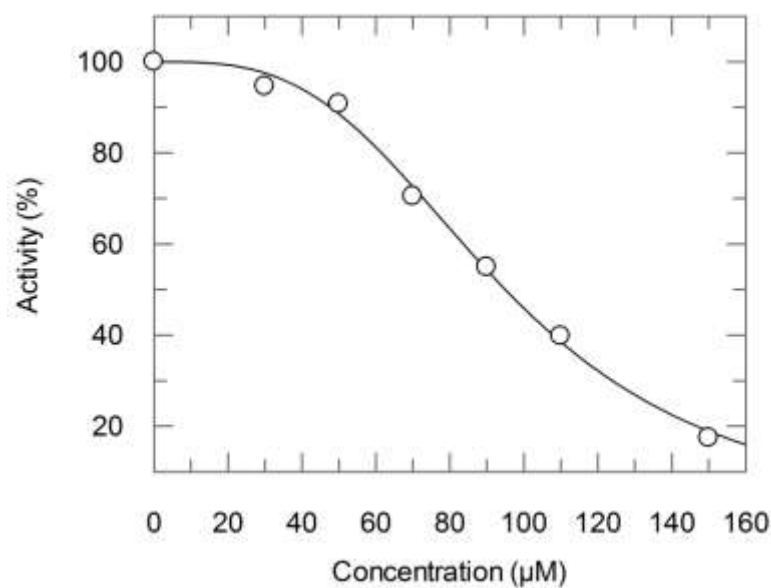
Προσδιορισμός IC₅₀

Η IC₅₀ των αναστολέων που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αναστολή προσδιορίστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

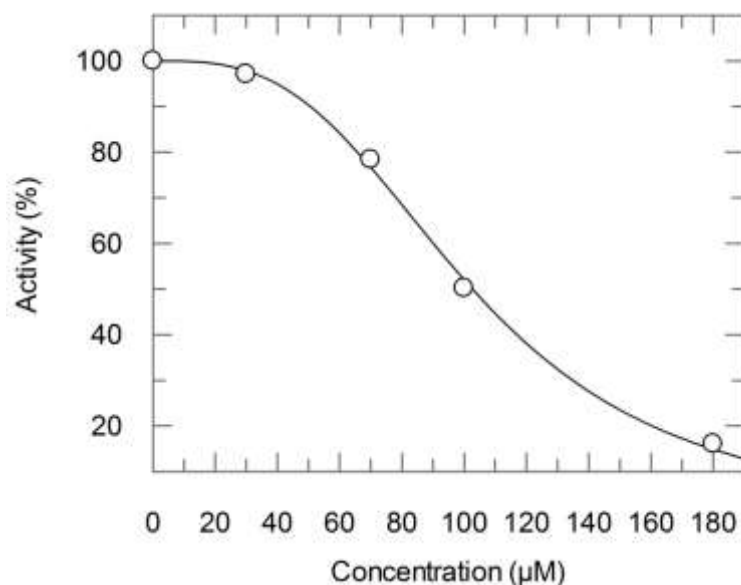
Πίνακας 6 IC₅₀ των αναστολέων και σχετικά διαγράμματα

Αναστολέας	IC ₅₀
GB-P2-4a	95.004±1.4355μM
GB-P2-4'a	102,6±1,7μM
GB-P2-4'j	137,24±1.568μM

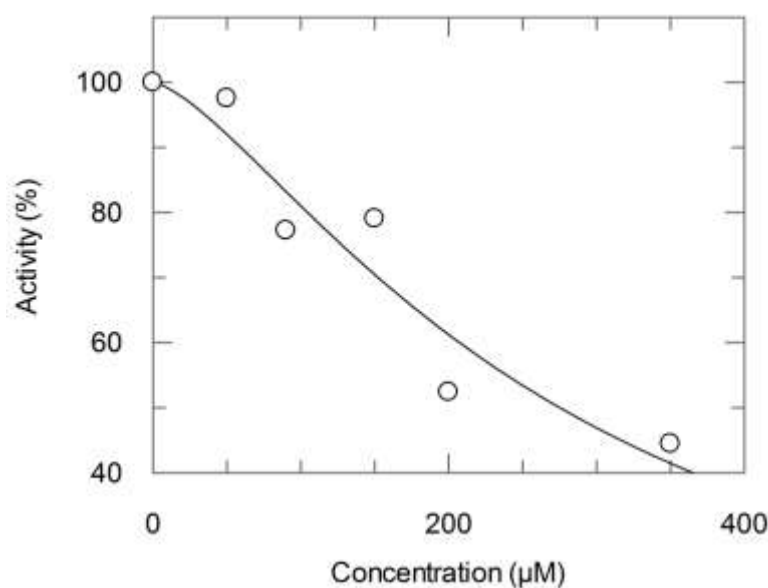
Εικόνα 13 Καμπύλη IC₅₀ για τον αναστολέα GB-P2-4a (Συγκεντρώσεις: 0, 30, 50, 70, 90, 110, 150μM θερμοκρασία 30οC)



Εικόνα 14 Καμπύλη IC50 για τον αναστολέα GB-P2-4'α (Συγκεντρώσεις: 0, 30, 70, 100, 180μΜ θερμοκρασία 30oC)



Εικόνα 15 Καμπύλη IC50 για τον αναστολέα GB-P2-4'j (Συγκεντρώσεις: 0, 50, 90, 150, 200, 350μΜ θερμοκρασία 30oC)

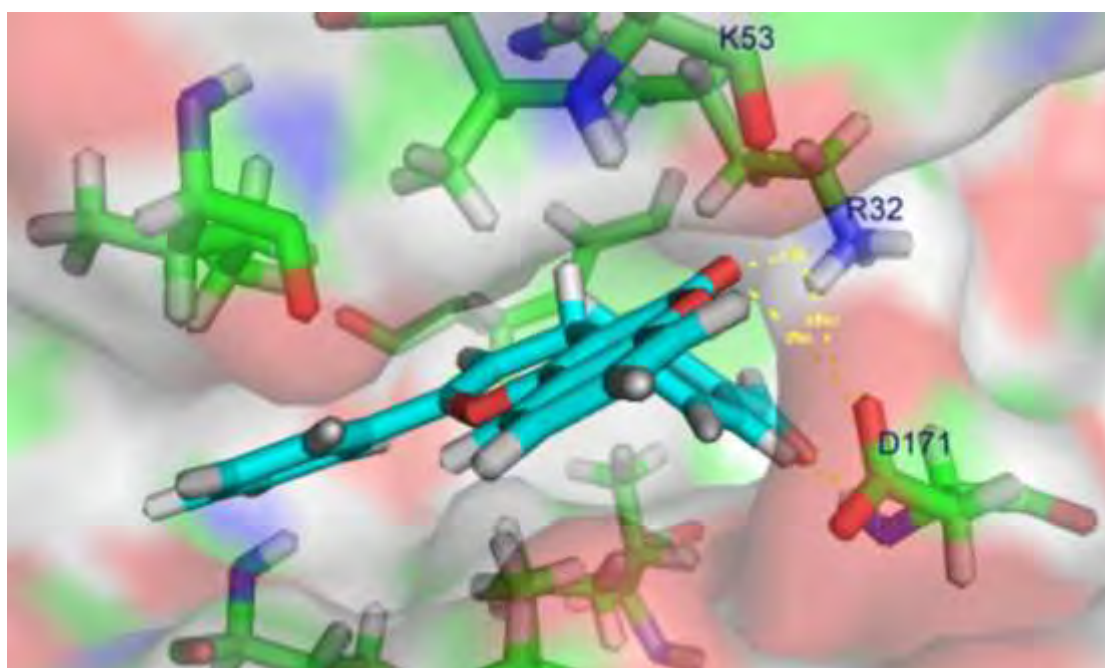


Μελέτη αναστολής στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου

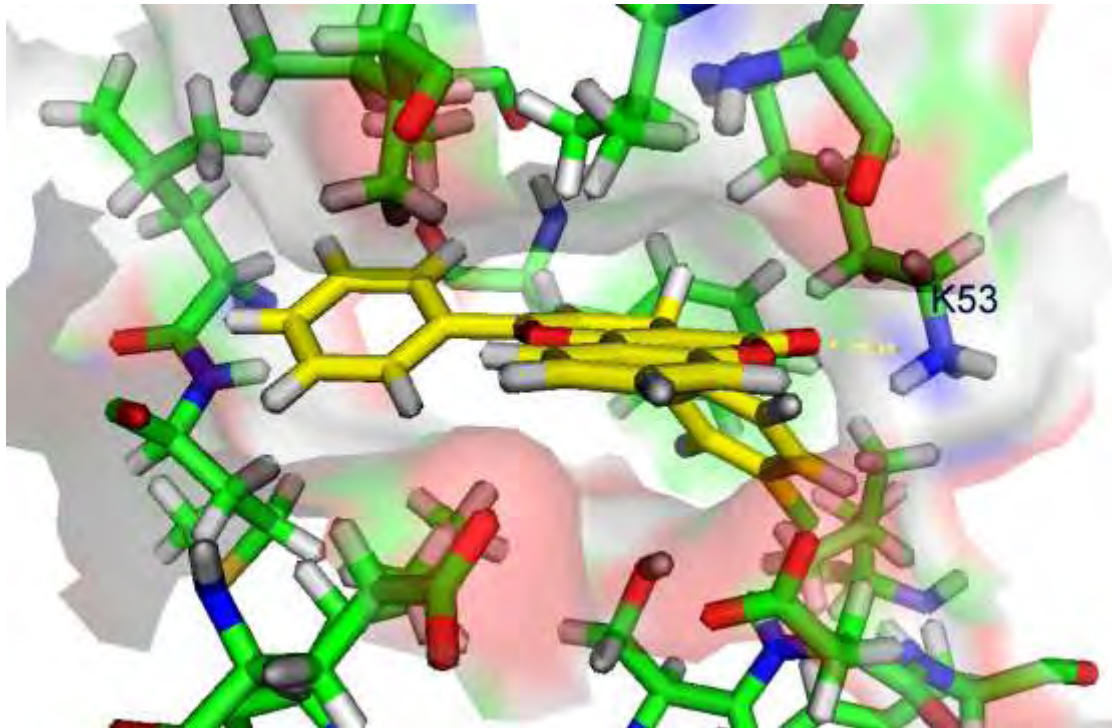
Με τον έλεγχο που έγινε για την αναστολή που παρουσίαζαν οι παραπάνω αναστολείς στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαπιστώθηκε ότι ο 4'j παρουσίαζε ισχυρή αναστολή στη φωσφορυλάση οπότε δεν χρησιμοποιήθηκε στα μετέπειτα πειράματα. Αντίθετα οι 4'α και 4a φαίνεται ότι παρουσίαζαν εξειδίκευση στην ΡhK κάτι που επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι παρουσίαζαν αναστολή μικρότερη του 10% για τη φωσφορυλάση.

In silico δομικές μελέτες-Εύρεση αλληλεπιδράσεων

Από το docking προέκυψε ο τρόπος σύνδεσης κάθε αναστολέα με το εκάστοτε ένζυμο. Επιπλέον με το πρόγραμμα CCP4 έγινε εύρεση των εν δυνάμει δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ του ενζυμικού μορίου της *gmPhK* και του μορίου του αναστολέα. 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*. Οι αναστολείς που μελετήθηκαν ήταν οι GB-P2-4a και GB-P2-4'a. Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται ότι ο GB-P2-4a σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το ένζυμο *gmPhK* ενώ ο GB-P2-4'a δύο. Στη *hPhK* παρατηρούνται 1 δεσμός υδρογόνου από τον GB-P2-4a και 4 δεσμοί υδρογόνου από τον GB-P2-4'a. Ακόμη παρατηρούνται δυνάμεις *van der Waals* μεταξύ των αναστολέων και του ενζύμου. Τέλος ο αναστολέας GB-P2-4a δημιουργεί δεσμό αλογόνου στη Phe172 κάτι που σταθεροποιεί περαιτέρω τη σύνδεσή του. Ο διαφορετικός προσανατολισμός πρόσδεσης του GB-P2-4'a για την *hPhK* οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με το Asp171 που εντοπίζεται στην περιοχή DFG του βρόχου ενεργοποίησης. Αυτή η αλληλεπίδραση αλλάζει την διαμόρφωση του Asp171 στο χώρο εμποδίζοντας, συνεπώς, την δέσμευση ATP / Mg^{2+} .



Εικόνα 16 Ο αναστολέας GB-P2-4'a με την *hPhK* (PyMol)



Εικόνα 17 Ο αναστολέας GB-P2-4a με την hIhPhK (PyMol)

Πίνακας 7 Δεσμοί Υδρογόνου και Van der Waals της rmPhK και των αναστολέων 4a και 4'a

GB-P2-4a		
	Hydrogen bonds (~3.35 Å)	Van der Waals (~4.0 Å)
rmPhK	Lys48(NZ)	
Total	1	78
hIhPhK	Lys53(NZ)	(Phe172 halogen bond)
Total	1	74

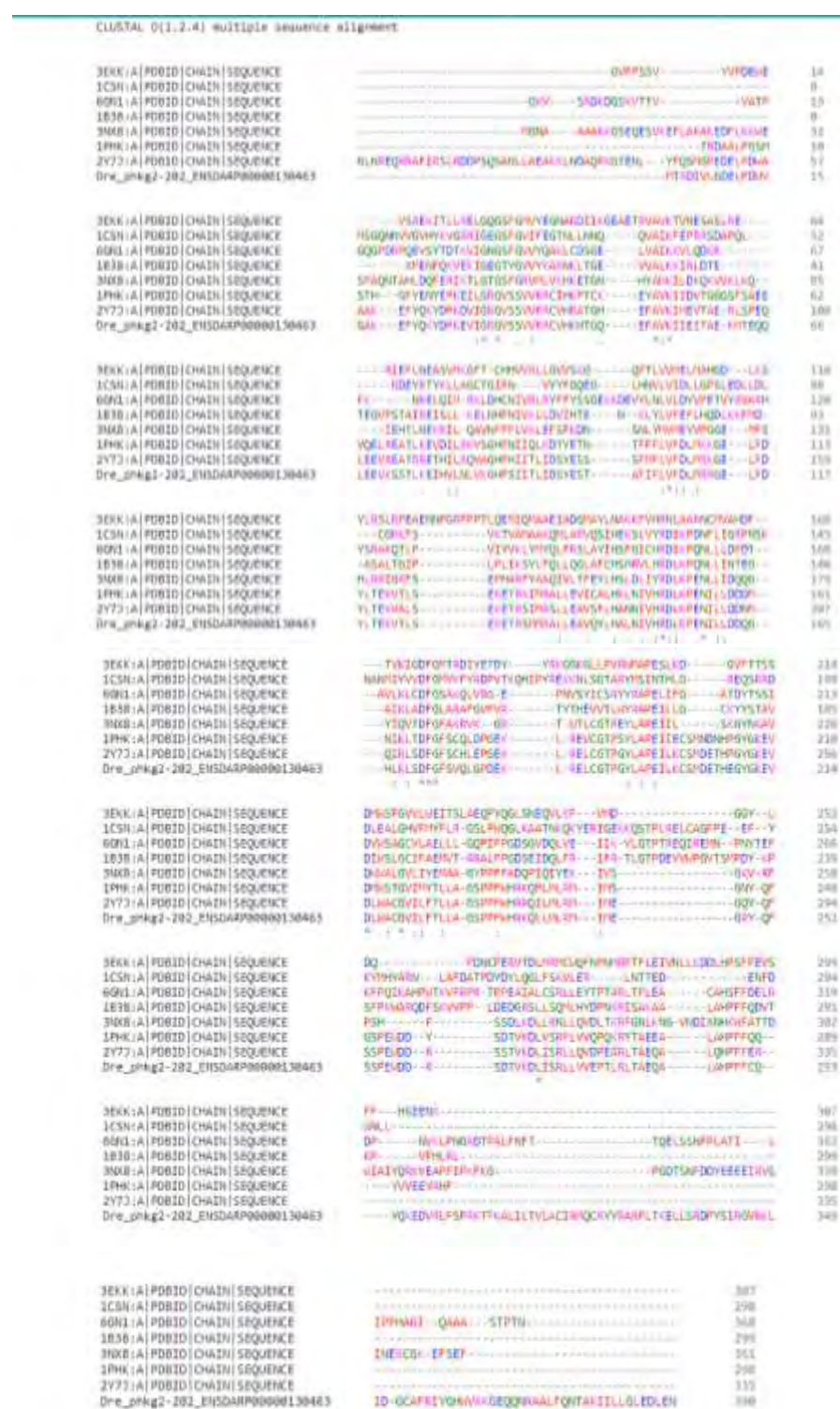
GB-P2-4'a		
	Hydrogen bonds (~3.35 Å)	Van der Waals (~4.0 Å)

rmPhK	Lys48(NZ), Thr166(OG1)	
Total	2	63
hlPhK	Lys53(NZ), Arg32(O), Asp171(N, OD1)	
Total	4	73

Στοιχίση αλληλουχιών

Μετά τη στοιχίση των αλληλουχιών όπως προαναφέραμε παρατηρήσαμε τις εμφανείς ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών των κινασών. Οι περιοχές που δημιουργούσαν δεσμούς υδρογόνου με τους αναστολείς παρουσίαζαν συνήθως μεγάλο βαθμό συντήρησης μεταξύ των κινασών πράγμα που υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένοι αναστολείς πιθανόν να μην παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση για την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα η Lys και των δύο ισομορφών και το Asp171 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση σε όλες τις κινάσες που στοιχίσαμε, ενώ η Thr166 και η Arg32, σχετικά χαμηλότερη.

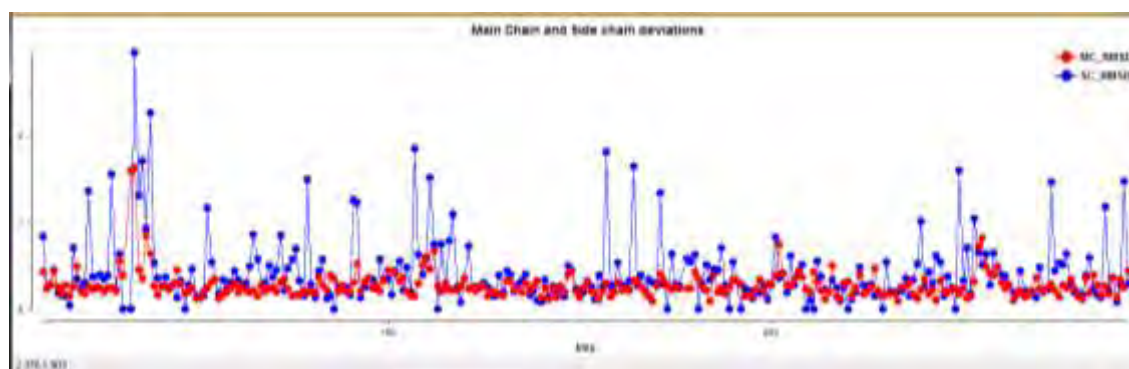
Εικόνα 18 Στοιχισμός των αλληλουχιών των κινασών που προαναφέρθηκαν



	Thr166	Χαμηλή (ή σερίνη)
hIPhK	Lys53	Ισχυρή
	Arg32	Μέτρια (T, E, N, Q)
	Asp171	Ισχυρή

Δομική Υπέρθωση

Έγινε δομική υπέρθεση των αλληλουχιών της PhK με το πρόγραμμα superpose του CCP4. Η δομική υπέρθεση συγκρίνει τις συντεταγμένες όλων των αμινοξέων δύο διαφορετικών αμινοξικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα ανέδειξε την αλλαγή στον προσανατολισμό του Asp171 που ανήκει στο μοτίβο DFG από τον αναστολέα GB-P2-4'a. Από την υπέρθεση αυτή εντοπίζονται και άλλες περιοχές που φαίνεται να διαφέρουν όπως η περιοχή του αμινοτελικού άκρου.



Εικόνα 19 Οι αλληλουχίες της hIPhK με και χωρίς τον αναστολέα Gb-P2-4'a. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η hIPhK χωρίς τον αναστολέα ενώ με μπλε με τον αναστολέα.

Συζήτηση

Τα περισσότερα ανάλογα κουμαρίνης παρουσίασαν καθόλου ή εξαιρετικά χαμηλή αναστολή. Οι αναστολείς GB-P2-4a και GB-P2-4'a έδειξαν πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το IDF (induced fit docking) έδειξε ότι και οι δύο αναστολείς συνδέονται στο κέντρο πρόσδεσης του ATP (Τύπου I). Παρουσιάζουν πολυάριθμες van der Waals αλληλεπιδράσεις όχι όμως και αρκετούς δεσμούς υδρογόνου λόγω έλλειψης πολικών ομάδων.

Ο αναστολέας GB-P2-4a σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με μια ισχυρά συντηρημένη λυσίνη (Lys48 και Lys53) και στις δύο ενζυμικές ισομορφές. Στην ηπατική ισομορφή το C1' σχηματίζει επιπλέον δεσμό αλογόνου με την Phe172 στην αμινοξική ομάδα. Αντίθετα

στην μυϊκή ισόμορφή το C1' δεν εμφανίζει τέτοιου είδους δεσμούς. Στον αναστολέα GB-P2-4'a το C1' αντικαθίσταται με μια ομάδα CHO. Το οξυγόνο της ομάδας αυτής σχηματίζει επιπλέον δεσμούς υδρογόνου με τη Thr166 στην rmPhK και με την Arg32 και το Asp171 στην hPhK. Τα αμινοξέα αυτά δεν συντηρούνται ισχυρά ανάμεσα στις πρωτεϊνικές κινάσες αποτελώντας παράγοντες εξειδίκευσης και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ώστε να αλληλεπιδράσουν με εξειδικευμένους αναστολείς. Ο διαφορετικός προσανατολισμός πρόσδεσης του GB-P2-4'a για την hPhK οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με το Asp171 που εντοπίζεται στην περιοχή DFG του βρόχου ενεργοποίησης και είναι υπεύθυνο για τη σωστή σύνδεση των μετάλλων που συντονίζουν τη σωστή δέσμευση του ATP. Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί σημαντική μετατόπιση της ομάδας του καρβονυλίου του Asp171 στο χώρο εμποδίζοντας, συνεπώς, τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με το Mg⁺ στο σύμπλοκο ATP/Mg⁺. Επιπλέον είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία [15] ότι οι αναστολείς που διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις του Asp του DFG μοτίβου όπως πχ οι αναστολείς τύπου II παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε κυτταρικό επίπεδο.

Συμπερασματικά η μελέτη σύνδεσης των αναλόγων κουμαρίνης ανέδειξε τους αναστολείς Gb-P2-4a και Gb-P2-4'a οι οποίοι παρά το γεγονός ότι δεν είναι ισχυροί μας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ποιοι προσδέτες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για το σχεδιασμό εξειδικευμένων αναστολέων.

Παράρτημα

Συντομογραφίες

G1P	1-φωσφορική γλυκόζη
G6P	6-φωσφορική γλυκόζη
GBE	Ένζυμο διακλάδωσης γλυκογόνου
PhK	Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
GP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
GDE	Ένζυμο αποδιακλάδωσης γλυκογόνου
AMP	5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
PP1	Πρωτεϊνική φωσφατάση 1
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
rmGP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
PLP	5'-Φωσφορική πυριδοξάλη
Ki	Σταθερά αναστολής
GPa	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου α
GPb	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου β

ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης
Mg²⁺	Ιόντα μαγνησίου
Mn²⁺	Ιόντα μαγγανίου
cAMP	Κυκλική 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
FDA	Παγκόσμιος Οργανισμός Φαρμάκων
GS	Συνθάση του γλυκογόνου
SDS	Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
PKA	Πρωτεϊνική κινάση Α
IP3	1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη
Ca²⁺	Ιόντα ασβεστίου
EM	Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία
PDB	Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
CaCl₂	Χλωριούχο ασβέστιο
(CH₃COO)₂Mg	Οξικό μαγνήσιο
BSA	Βόεια Αλβουμίνη Ορού
P_i	Ορθοφωσφορικό ανιόν
HCl	Υδροχλώριο
NaOH	Υδροξείδιο του Νατρίου
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
NaN₃	Νατραζίδιο
rmPhKγtrunc	γ καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού
IPTG	Ισοπρόπυλο-θείο-γαλακτοζίτης
β-GP	μετά νατρίου άλας της β-φωσφορικής γλυκερόλης
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
MTG	Μόνο-θείο-γλυκερόλη
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
KCl	Χλωριούχο κάλιο
Tris	Τρις (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο
BES	N,N-δισ (2-υροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ
Hepes	4- (2-υδροξυαιθυλο) -1-πιπεραζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
KH₂PO₄	Δις-όξινο-φωσφορικό κάλιο

Διαλύματα

Ρυθμιστικό δ/μα ηλεκτροφόρησης 10x (500mL)

15 gr Tris
72 gr Glycine
5 gr SDS

LB Broth Handmade (1L)
10 g tryptone
5 g yeast extract
10 g NaCl
Ρύθμιση του pH στο 7 με μερικές σταγόνες NaOH

2YT (1L)
16 g tryptone
10 g yeast extract
5 g NaCl
Ρύθμιση του pH στο 7 με μερικές σταγόνες NaOH

Πήκτωμα επιστοιβαξης 5 % (3mL)
2,1 mL dH₂O
0,5 mL 30 % διαλύματος ακρυλαμιδίου/ bis-ακρυλαμιδίου (29: 1 w/w ακρυλαμίδιο: bis-ακρυλαμίδιο)
0,38 mL 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
30 μL 10 % SDS
30 μL 10 % APS
3 μL TEMED

Πήκτωμα διαχωρισμού 10 % (5mL)
1,9 mL ddH₂O
1,7 mL 30 % διαλύματος ακρυλαμιδίου/ bis-ακρυλαμιδίου (29: 1 w/w ακρυλαμίδιο: bis-ακρυλαμίδιο)
1,3 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
50 μL 10 % SDS
50 μL 10 % APS
2 μL TEMED

Πήκτωμα διαχωρισμού 12 % (5mL)
1,6 mL dH₂O
2 mL 30 % διαλύματος ακρυλαμιδίου/ bis-ακρυλαμιδίου (29: 1 w/w ακρυλαμίδιο: bis-ακρυλαμίδιο)
1,3 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
50 μL 10 % SDS
50 μL 10 % APS
2 μL TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer)
240mM Tris-HCl pH 6,8
40% Glycerol
8% SDS
5% β- mercaptoethanol
0.04% Bromophenol Blue

Δ/μα χρωστικής Coomassie (φωτοευαίσθητη)
40 % μεθανόλη
10 % οξικό οξύ
50 % dH₂O
0,1 % (w/v) Coomassie R-250

TEA Buffer (1L)

TEA/HCl 100 mM

EDTA 1mM

DTT 2mM Ρύθμιση pH στο 6,8 με πυκνό HCl

Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

Αρχικά ζυγίζουμε 6.5 g Na₂CO₃ και 2.44 g EDTA για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος. Οι μεμβράνες διαπίδυσης τοποθετούνται στο παραπάνω διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο H₂O. Τοποθετούνται σε απιονισμένο H₂O και αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C.

Βιβλιογραφία

1. Aiston, S., M.P. Coghlan, and L. Agius, *Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis*. Eur J Biochem, 2003. **270**(13): p. 2773-81.
2. Begum, J., et al., *An evaluation of indirubin analogues as phosphorylase kinase inhibitors*. J Mol Graph Model, 2015. **61**: p. 231-42.
3. Camus, S., et al., *Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish*. Oncogene, 2012. **31**(39): p. 4333-42.
4. Katsori, A.M. and D. Hadjipavlou-Litina, *Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014)*. Expert Opin Ther Pat, 2014. **24**(12): p. 1323-47.
5. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. Eighth edition. ed. 2015, New York: W.H. Freeman & Company, a Macmillan Education Imprint. 1 volume (various pagings).
6. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2): p. 149-58.
7. Gatica, M., et al., *Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis**. FEBS Lett, 1993. **315**(2): p. 173-7.
8. Scott, J.D., et al., *Primary-structure requirements for inhibition by the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1613-6.
9. Huang, C.K. and G.R. Laramee, *Stimulation of a histone H4 protein kinase in Triton X-100 lysates of rabbit peritoneal neutrophils pretreated with chemotactic factors: effect of leukotriene B4 and cytochalasin B*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(2): p. 158-62.
10. Johnson, L.N., *The regulation of protein phosphorylation*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 627-41.
11. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle*. J Biol Chem, 1968. **243**(13): p. 3763-5.
12. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
13. Roskoski, R., Jr., *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors*. Pharmacol Res, 2015. **100**: p. 1-23.
14. Wu, P., T.E. Nielsen, and M.H. Clausen, *FDA-approved small-molecule kinase inhibitors*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(7): p. 422-39.
15. Liu, Y. and N.S. Gray, *Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(7): p. 358-64.
16. Kostich, M., et al., *Human members of the eukaryotic protein kinase family*. Genome Biol, 2002. **3**(9): p. RESEARCH0043.
17. Wu, P., T.E. Nielsen, and M.H. Clausen, *Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs*. Drug Discov Today, 2016. **21**(1): p. 5-10.
18. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
19. Brushia, R.J. and D.A. Walsh, *Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D618-41.
20. Venien-Bryan, C., et al., *The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase*. Structure, 2009. **17**(1): p. 117-27.
21. Winchester, J.S., et al., *In Silico characterization of phosphorylase kinase: evidence for an alternate intronic polyadenylation site in PHKG1*. Mol Genet Metab, 2007. **92**(3): p. 234-42.

22. Psarra, A.M. and T.G. Sotiroudis, *Subcellular distribution of phosphorylase kinase in rat brain. Association of the enzyme with mitochondria and membranes*. Int J Biochem Cell Biol, 1996. **28**(1): p. 29-42.
23. Skamnaki, V.T., et al., *Structural analysis of the Rhizoctonia solani agglutinin reveals a domain-swapping dimeric assembly*. FEBS J, 2013. **280**(8): p. 1750-63.
24. Owen, D.J., et al., *Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product*. Structure, 1995. **3**(5): p. 467-82.
25. Lowe, E.D., et al., *The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition*. EMBO J, 1997. **16**(22): p. 6646-58.
26. Skamnaki, V.T., et al., *Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies*. Biochemistry, 1999. **38**(44): p. 14718-30.
27. Skamnaki, V.T. and N.G. Oikonomakos, *Kinetic characterization of the double mutant R148A/E182S of glycogen phosphorylase kinase catalytic subunit: the role of the activation loop*. J Protein Chem, 2000. **19**(6): p. 499-505.
28. Hayes, J.M., et al., *Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: the role of water molecules examined*. Proteins, 2011. **79**(3): p. 703-19.
29. Burda, P. and M. Hochuli, *Hepatic glycogen storage disorders: what have we learned in recent years?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015. **18**(4): p. 415-21.
30. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
31. Carafoli, E., *Calcium signaling: a tale for all seasons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1115-22.
32. Jesty, J., *The determination of enzyme-cofactor dissociation constants by kinetic methods: a correction*. Thromb Res, 1988. **50**(5): p. 745-6.
33. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
34. Thakur, A., R. Singla, and V. Jaitak, *Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies*. Eur J Med Chem, 2015. **101**: p. 476-95.
35. Bukau, B., J.M. Brass, and W. Boos, *Ca²⁺-induced permeabilization of the Escherichia coli outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein-dependent transport*. J Bacteriol, 1985. **163**(1): p. 61-8.
36. Aich, P., et al., *Calcium chloride made E. coli competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein*. Protein J, 2012. **31**(5): p. 366-73.
37. Uyttenhove, K., M. Bollen, and W. Stalmans, *An optimized assay of phosphorylase kinase in crude liver preparations*. Biochem J, 1991. **278 (Pt 3)**: p. 899-901.
38. King, E.J., *The colorimetric determination of phosphorus*. Biochem J, 1932. **26**(2): p. 292-7.
39. Barnard, A.S., *In silico veritas*. ACS Nano, 2014. **8**(7): p. 6520-5.
40. Meng, X.Y., et al., *Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*. Curr Comput Aided Drug Des, 2011. **7**(2): p. 146-57.